Etude de systèmes protéolytiques et anti-protéolytiques impliqués dans la remobilisation de l'azote au cours de la sénescence chez les Brassicacées (Arabidopsis thaliana L., Brassica napus L)

Maxence James

▶ **To cite this version:**

Maxence James. Etude de systèmes protéolytiques et anti-protéolytiques impliqués dans la remobilisation de l'azote au cours de la sénescence chez les Brassicacées (Arabidopsis thaliana L., Brassica napus L). Agronomie. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMC275 . tel-02163516

HAL Id: tel-02163516

https://theses.hal.science/tel-02163516

Submitted on 24 Jun 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES AGRONOMIQUES, BIOTECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Etude de systèmes protéolytiques et anti-protéolytiques impliqués dans la remobilisation de l'azote au cours de la sénescence chez les Brassicacées (Arabidopsis thaliana L., Brassica napus L)

Présentée et soutenue par
Maxence JAMES

Thèse soutenue publiquement le 18/12/2018 devant le jury composé de		
M. BERTRAND HIREL	Directeur de recherche, INRA de Versailles	Rapporteur du jury
Mme ANNE REPELLIN	Professeur des universités, université Paris-est créteil (UPEC)	Rapporteur du jury
Mme MARIE-PASCALE PRUD'HOMME	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Président du jury
Mme MICHELE REISDORF-CREN	Maître de conférences, Université de Versailles Saint-Quentin	Membre du jury
M. JACQUES TROUVERIE	Maître de conférences, Université Caen Normandie	Membre du jury
M. PHILIPPE ETIENNE	Maître de conférences HDR, Université Caen Normandie	Directeur de thèse

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

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N,C,S

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier les deux capitaines de ce petit mais audacieux navire qu'est l'UMR 950 INRA-UCBN EVA. Je remercie donc la directrice et le directeur adjoint **Marie-Pascale Prud'homme** et **Philippe Laîné** qui m'ont accueilli durant 6 années au sein du laboratoire. Votre bienveillance et votre positivité font de ce laboratoire un endroit agréable à travailler. Merci pour tout ce que vous nous apportez et ce que vous apporterez encore à ce joli navire.

Je tiens ensuite à remercier le Pr. **Anne Repellin** et le Dr. **Bertrand Hirel** qui ont accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse. Je remercie également le Dr. **Michèle Reisdorf-Cren** et le Pr. **Marie-Pascale Prud'homme** d'avoir accepté d'être examinatrices de mon travail.

Mes remerciements vont également à **l'école doctorale EdNBISE** et au **projet RAPSODYN** pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans d'excellentes conditions, avec un environnement financier des plus confortables. Je les remercie pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser des déplacements à l'étranger : Oxford et Corée du Sud.

Je ne trouve pas de mots assez forts pour remercier les deux personnes sans qui tout cela n'aurait été possible, mes deux directeurs de thèse, **Philippe Etienne** et **Jacques Trouverie**. Je n'oublierai jamais tout ce que vous avez fait pour moi. Vous avez transformé cette expérience professionnelle, qui n'a pas été des plus simples en une belle aventure humaine. J'ai passé 3 années avec vous, 3 années pleines de rebondissements, 3 années avec des moments durs mais aussi et surtout de supers bons moments. Vous avez toujours été là pour moi, vous avez su faire preuve de patience et vous m'avez tiré vers le haut, et cela n'a pas de prix à mes yeux. J'ai énormément apprécié travailler à vos côtés, vous avez le don de savoir faire la part des choses entre le travail et le loisir. Durant ces 3 années, vous m'avez donné toutes vos ficelles pour devenir un bon chercheur, vous avez façonné mon regard critique dans tout ce que j'entreprends, à moi d'en faire le plus bel usage. La thèse est une épreuve dans une vie de jeune chercheur, à vos côtés, elle est passée d'une épreuve à un cadeau. Je vous remercie pour tout, je pourrais écrire des pages et des pages pour vous remercier et dire ce que vous m'avez apporté, mais ce ne sont que des mots et je préfère les gestes. Je terminerai sur une citation qui résume en quelque sorte ce que vous m'avez appris durant ces 3 années : « *Les difficultés ne sont pas faites pour abattre mais pour être abattues* » *Charles de Montalembert.*

Je n'oublie pas de remercier l'équipe du Dr. Céline Masclaux-Daubresse (**Céline Masclaux-Daubresse, Anne Marmagne, Fabien Chardon, Fabienne Soulay, Michèle Reisdorf-Cren…**) pour leur accueil au sein de l'IJPB, ainsi que pour les nombreux échanges qui m'ont permis d'avancer dans mes travaux. Je tiens à remercier plus particulièrement **Céline** qui aura finalement suivi avec attention et avec un regard bienveillant mes travaux tout au long de ces 3 ans. Un grand merci pour le temps que tu as su prendre pour moi, les nombreuses corrections, nos nombreux échanges. Tu as su apporter ta pierre à mon édifice et je t'en remercie. Je remercie également tous **les partenaires RAPSODYN** avec qui j'ai échangé et travaillé durant mes 6 ans au sein de ce projet. Avec une attention plus particulière à **Alain Bouchereau**, **Nathalie Nesi**, **Annick Bellamy** et **Jean-Christophe Avice** qui ont su gérer brillamment ce projet et les nombreuses journées RAPSODYN. Je tenais aussi à remercier le Pr **Tae-Hwan Kim** et le Dr. **Bok-Rye Lee**

pour leur accueil au sein de leur laboratoire en Corée du Sud et pour avoir fait de ce voyage, une belle expérience.

Je remercie ensuite toutes les personnes du laboratoire EVA. Tout d'abord, je remercie l'ensemble des enseignants chercheurs : **J-C, Philippe E, Jacques, Philippe L, Marie Pascale, Servane, Annette, J-B, Emmanuelle, Sophie BM, Alain, Frédérik LD, Frédérick M** et **Sylvain**. Un grand merci pour votre pédagogie durant toutes mes années universitaires. Une pédagogie qui m'a fait découvrir et apprécier le monde du végétal et qui m'a surtout permis d'arriver là où j'en suis aujourd'hui. Merci au bureau enchanté pour votre bonne humeur. **J-B**, j'espère que tu continueras à supporter **Servane** et **Annette** dans ton bureau surtout lorsqu'**Annette** oublie soit ses clés et/ou son badge, ou sa capsule ou d'allumer la cafetière, ou sa tasse… **Annette** et **Servane**, j'espère que vous continuerez à supporter **J-B** dans votre bureau, prenez en soin, il nous a tant apporté avec son « Atelier Doc ». **Emma**, fidèle collaboratrice des mots fléchés du midi, on aura appris beaucoup de choses à tes côtés, merci pour le partage de ton savoir. **Sophie BM**, notre presse people du laboratoire, la reine des potins, merci d'avoir partagé ta joie de vivre, d'avoir sans cesse le sourire et de nous le transmettre ! Je n'ai jamais osé te le dire mais je suis le cousin de Léonardo DiCaprio. **Alain** et **FLD**, merci pour la pertinence de vos remarques et de vos questions dans les nombreux débats d'idées. Votre culture m'impressionnera toujours. Je terminerai par dire merci à **J-C**, malgré une distance qui s'est installée dernièrement entre nous, je n'oublierai pas tout ce que tu as fait pour moi, tout ce que tu m'as apporté. Je suis conscient aujourd'hui que si tu n'avais pas été là, je n'aurais surement pas fait de thèse, un grand merci !

Je continuerai ensuite par remercier les petites mains de ce laboratoire, pour l'aide et la joie que vous m'avez apporté : **Magalie, Josette, Julie, Fanny, Jéhanne, Frédérine, Manue, Olivier, Anne-Francoise, Sophie, Josiane, Bénédicte, Patrick, Dominique**… Merci à **Magalie** et **Josette** pour votre écoute, votre gentillesse, d'avoir toujours été là quand j'en avais besoin. **Julie**, un grand merci pour ton énorme soutien en BM, nos nombreux échanges taquins et nos chamailleries vont me manquer. **Fanny, Jéhanne, Frédérine** et **Manue**, un quatuor plein de vie et de folie, merci d'égayer toutes mes matinées avec votre pêche, votre joie et votre humour, ne changez surtout pas ! **Sophie** et **Olivier**, merci d'avoir toujours été là, d'avoir toujours pris le temps de régler mes problèmes ou de répondre à mes demandes. **Anne-Françoise**, je te remercie pour ton écoute. Malgré le peu de culture que j'ai eu en serre durant ma thèse, je te remercie pour l'énorme soutien que tu m'as apporté dans les récoltes avec **Josiane**, tu m'auras enlevé de nombreuses épines du pied.

Je n'oublie pas, bien sûr, l'ensemble des doctorants avec qui j'ai partagé énormément de moments. Pour commencer, je remercie les anciens docs : **Philippe, Vincent, Caro, Alexandra, Elise S, Anne, Thais, Marine** de m'avoir accueilli et d'avoir su partager votre expérience. J'ai passé d'excellents moments avec vous, de belles soirées. Je n'oublierai pas les nombreux clips vidéo dignes d'Hollywood que j'ai réalisé avec vous et pour vous. Un grand merci à ma grande sœur, **Marine.** Tu fais partie des personnes qui m'ont le plus apporté dans le laboratoire d'un point de vue professionnel et personnel. Je n'oublierai jamais les supers bons moments passés ensemble et nos péripéties à Oxford et en Corée du Sud qui nous auront laissés beaucoup de souvenir. **Elise T**, ma droguée, merci pour tous les bons moments qu'on a partagé ensemble, tu m'auras bien fait rire. Prends soin de toi ! Les **Pioupiou** : **Caliméro** et **Mélie**, un grand merci pour ces 3 agréables années passées à vos côtés. J'espère que je n'ai pas été trop dur à supporter avec mon goût pour la bonne musique. On a très peu partagé sur nos travaux mais ça n'a pas empêché d'être là, les uns pour les autres et de se serrer les coudes durant les coups durs! Je vous souhaite plein de

bonheur et de réussite pour la suite. Je souhaite également plein de bonne réussite et de vivre une belle expérience professionnelle et humaine aux **nouveaux Pioupiou : Victor, Charlotte, Hans, Galatea, Hanh, Aurélien** et **Momoh**. Merci à **Antoine** et **Laëtitia**, prenez soin des nouveaux docs comme vous l'avez fait avec nous. Je remercie tous les stagiaires que j'ai vu défiler dans le bureau et dans le labo, pour tous les bons moments passés ensemble : **Antoine, Laetitia, Lethicia, Momoh, Cyrile, Lisa**… Mes plus profonds remerciements vont à toi **Aurelia**. Merci d'avoir été là pendant ces 3 années, tu as su transformer ces 3 années de thèse en une superbe expérience humaine. Je ne serais sûrement pas arrivé jusqu'au bout sans toi. Tu as été mon moyen de décompression, ma confidente, une vraie sœur pour moi, MERCI !!!

Je tiens également à remercier tous mes amis, toujours là pour le meilleur et pour le pire. Vous m'avez soutenu de près ou de loin, écouté, conseillé pendant ces 3 longues années, je vous dois beaucoup après tant d'années. Un grand merci plus particulièrement à **Toinou, Billouz, Clément, Dédé, Matthieu, Estelle, Max, Marie, Cliclic, Gwen, Cristiana**… Vous êtes des amis en or sur qui je peux toujours compter.

Je n'oublie surtout pas ma famille qui me supporte depuis 27 ans ! **Mes 4 parents**, tous mes frangins et sœurs qui ont toujours été là pour moi et qui m'ont soutenu par leur simple présence pendant ces 3 années. Je vous remercie d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir toujours poussé au-delà de mes capacités à toujours aller de l'avant. Je n'oublie pas mes **beaux-parents** et **mon bof** qui sont ma nouvelle famille et qui ont toujours été là pour moi.

Mes derniers remerciements vont à l'une des personnes les plus importantes à mes yeux, **ma Doudou**, **ma Femme**. Un grand merci pour tout le soutien que tu m'as apporté depuis tout ce temps et surtout durant ces 3 dernières années de thèse. Trois années pleines de rebondissements, d'amour et de stress. Sans toi, je n'y serai jamais arrivé, tu as su me faire prendre confiance en moi et me pousser vers l'avant. Je ne serai jamais assez reconnaissant pour tout ce que tu m'as apporté et ce que tu m'apportes tous les jours. Je n'oublie pas, bien sûr, nos « deux enfants » relous que j'aime : **Kina** et **Pilou** qui, malgré que ce soit de vrais chieurs, nous apportent beaucoup, et m'ont permis de décompresser durant ces 3 années.

« ***La réussite appartient à tout le monde. C'est au travail d'équipe qu'en revient le mérite*** »

ABRÉVIATIONS

AA : Acide aminé
ABA : Abscisic acid
ADN : Acide désoxyribonucleique
ADNc : Acide désoxyribonucleique complémentaire
ANOVA : Analyses de variance
AP : Protéase à aspartate
ARN : Acide ribonucleique
AS : Asparagine synthétase
ASN : Asparagine
Atg : Autophagy related gene family
ATI1 : ATG8-INTERACTING PROTEIN1
ATP : Adénosine tri-phosphate

BET : Bromure d'éthidium
Bn : *Brassica napus* L.
BSA : Bovine serum albumine

Cau : *Brassica oleracea*
CCV : CV-containing vesicles
CETIOM : Centre technique interprofessionnel des oléagineux métropolitains
CIPAN : Culture intermédiaire piège à nitrate
CK : Citokinines
Clp : Protéases caséinolytique
CND41 : Chloroplast nucleoid DNA binding protein 41
CO_2 : Dioxyde de carbone
Col : Columbia
COMIFER : Le comité français d'étude et de développement de la fertilisation raisonnée
CP : Protéase à cystéines
CPSase : Carbamoylphosphatase
Ct : Cycle treshold

Da : Dalton
DAS : Jour après semis
Deg : Degradation of periplasmic proteins
DMSO : Diméthylsulfoxide
DTT : Dithiothréitol

EAA : Efficience d'assimilation de l'azote
EAbA : Efficience d'absorption de l'azote
ER : Réticulum endoplasmique
ERA : Efficience de remobilisation de l'azote
Eth : Ethylène
EUA : Efficience d'usage de l'azote
EUtA : Efficience d'utilisation de l'azote

FtsH : Filamentation temperature-sensitive H

GA : Acide gibbérellique
GDH : Glutamate déshydrogenase
GLN : Glutamine
GLU : Glutamate
GS : Glutamine synthase
GS1 : Glutamine synthétase cytosolique
GS2 : Glutamine synthétase chloroplastidiale
GOGAT : Glutamine 2-oxoglutarate aminotransférase

HATS : High affinity transport system
HI : Harvest Index
HN : High nitrogen

IJPB: Institut Jean-Pierre Bourgin
Inhi : Inhibiteur
INN : Indice de nutrition azote
INRA : Institut national de recherche agronomique
IRMS : Isotope-ratio mass spectrometry

KO : Knock out

LATS : Low affinity transport system
Lhcb : Light-harvesting chlorophyll-binding
LIBS : Laser induced breakdown spectroscopy
LN : Low nitrogen
LP : *Lepidium virginicum*

MC : Metacaspase
MeJa : Méthyl jasmonate
MMP : Matrix metalloproteinase
MnT : Million de tonnes

MP : Métalloprotéase
MPP : Mitochondrial processing-peptidase
MS : Matière sèche

N : Azote
NBI : Nitrogen balance index
NDVI : Normalized difference vegetation index
NH_4^+ : Ammonium
NHI : Nitrogen harvest index
NiR : Nitrite reductase
NIRS : Near infrared spectroscopy
NO_3^- : Nitrate
NR : Nitrate reductase
NRT : Nitrate root transporter

OAD : Outil d'aide à la décision
Os : *Oryza sativa*

PAR : Photosynthetically active radiation
PLCP : Papain-like cystein protease
PCR : Polymerase chain reaction
PVDF : Polyvinylidene difluoride

qPCR : quantitative polymerase chain reaction

RAPSODYN : Optimisation of the rapeseed oil content and yield under low nitrogen input
RBLC : RuBisCO
RCB : RuBisCO-containing bodies
RMN : Résonance magnétique nucléaire
ROS : Reactive oxygene species
RT-PCR : Reverse transcription polymerase chain reaction
RuBisCO : Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase

SA: Acide salicylique
SAG : Senescent associated gene
SAV : Senescent associated vacuole
SDG : Senescent down-regulated gene
SDS : Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE : SDS polyacrylamide gel electrophoresis
SE : Standard error
SP : Protéase à serine
Sub-L : Subtilisin-like protéase

TBS : Tris buffer saline
TBST : Tris buffer saline
TCN : Teneur critique en azote
TP : Protéasome

UPLC : Ultra performance liquid chromatography

VPE : Vacuolar processing enzyme

WSCP : Water soluble chlorophyll binding protein

SOMMAIRE

CHAPITRE I : INTRODUCTION GÉNÉRALE 1

CHAPITRE II : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE 5

A. LE COLZA D'HIVER ET LA NUTRITION AZOTÉE 6

A.I. GESTION DE L'AZOTE AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DU COLZA D'HIVER 6
A.I.1. Du semis à la reprise de végétation (stade C) 6
A.I.2. De la reprise de végétation (stade C) à la fin de la montaison (stade E) 8
A.I.3. De la floraison (stade F) à la récolte des graines (Stade G) 9
A.II. LES OUTILS DE PILOTAGE DE LA FERTILISATION N 9
A.II.1. Les méthodes de mesure du statut azoté 10
A.II.2. Les différentes formes d'intrants azotés. 12
A.III. L'EFFICIENCE D'USAGE DE L'AZOTE (EUA) CHEZ LE COLZA 13
A.III.1. Définitions et composantes de L'EUA 14
A.III.1.a. La composante EAbA : L'efficience d'Absorption de l'Azote 14
A.III.1.b. L'efficience d'Utilisation de l'azote (EUtA), l'autre composante de l'EUA 16
A.III.1.b.i. L'Efficience d'Assimilation de l'Azote (EAA) 16
A.III.1.b.ii. L'Efficience de Remobilisation de l'Azote (ERA) 17

B. DE LA SÉNESCENCE À LA REMOBILISATION DE L'AZOTE 19

B.I. LA SÉNESCENCE FOLIAIRE 20
B.I.1. Les processus associés à la sénescence foliaire 20
B.I.1.a. Phase n°1 : Initiation de la sénescence 20
B.I.1.a.i. Les facteurs endogènes 21
B.I.1.a.ii. Les facteurs exogènes 22
B.I.1.a.iii. Les phytohormones 24
B.I.1.b. Phase n°2 : Recyclage des composés cellulaires 25
B.I.1.c. Phase n°3 : Terminale 26
B.II. LES PRINCIPAUX ACTEURS DE LA REMOBILISATION DE L'AZOTE ASSOCIÉS À LA SÉNESCENCE 27
B.II.1. Les systèmes protéolytiques 27
B.II.1.a. Les protéases à sérine 30
B.II.1.b. Les protéases à aspartate 32
B.II.1.c. Les protéases à cystéine 33
B.II.2. Trafic vésiculaire associé à la protéolyse. 36
B.II.2.a. Le trafic vésiculaire dépendant de l'autophagie 36
B.II.2.a.i. Rubisco-Containing Bodies (RCBs) 36
B.II.2.a.ii. ATI1-PS bodies 37
B.II.2.b. Le trafic vésiculaire indépendant de l'autophagie 37
B.II.2.b.i. Les Senescence-Associated Vacuoles (SAVs) 37
B.II.2.b.ii. Les CV Containing Vesicles (CCVs) 38
B.II.3. Les systèmes anti-protéolytiques 38
B.II.3.a. Les Water Soluble Chlorophyll binding Proteins 39
B.II.3.a.i. Les WSCPs et la protection des chlorophylles 40
B.II.3.a.ii. Les WSCPs, des inhibiteurs de protéases 41

C. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE 43

CHAPITRE III : MATÉRIELS ET METHODES 47

A. CONDITIONS DE CULTURE ET DISPOSITIFS EXPÉRIMENTAUX 48

A.I. PREMIÈRE EXPÉRIMENTATION : ETUDE FONCTIONNELLE DE LA PROTÉASE SAG12 48
A.I.1. Conditions de cultures 48
A.I.2. Organisation des récoltes 49
A.II. DEUXIÈME EXPÉRIMENTATION : RÔLE D'UNE WSCP EXPRIMÉE LORS DE LA SÉNESCENCE 49
A.II.1. Conditions de culture 49
A.II.2. Organisation des récoltes 50
A.III. CONSTRUCTION ET SÉLECTION DES LIGNÉES TRANSGÉNIQUES 50

B. PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX 51

B.I. ETUDES DE L'ÉTAT PHYSIOLOGIQUE DE LA PLANTE 51
B.I.1. Mesure de la surface foliaire 51
B.I.2. Estimation des teneurs en chlorophylle 51
B.I.3. Analyse de la vigueur germinative 51
B.I.4. Analyse du développement des plantules 52
B.I.5. Etude de la capacité maximale d'absorption d'N racinaire des deux génotypes 52
B.II. ANALYSES ÉLÉMENTAIRES ET BIOCHIMIQUES 53
B.II.1. Détermination des teneurs en N et ^{15}N 53
B.II.2. Extraction et quantification d'acides aminés 54
B.III. ANALYSES PROTÉOMIQUES 54
B.III.1. Extraction et dosage des protéines solubles 54
B.III.2. Analyses de l'activité des différentes classes de protéases 55
B.III.3. Analyse de l'activité des protéases à sérine via l'utilisation de sondes fluorescentes 56
B.III.4. Analyse de l'activité protéasique d'un extrait protéique par zymogramme 57
B.III.5. Séquençage d'une bande protéique par Q-TOF LC/MS 57
B.III.6. Immunodection des protéines (Western-blot) 58
B.III.7. Immunolocalisation des protéines WSCP1 par microscopie 59
B.IV. MÉTHODES D'ANALYSES BIOMOLÉCULAIRES 60
B.IV.1. Extraction des ARNs totaux (ARNs) au phénol chaud et Reverse Transcription 60
B.IV.2. Polymerase Chain Reaction (PCR) et quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) 61
B.IV.3. Coloration GUS 63
B.V. ANALYSES STATISTIQUES 63

CHAPITRE IV : RÉSULTATS 64

A. SAG12, A MAJOR CYSTEINE PROTEASE INVOLVED IN NITROGEN ALLOCATION DURING SENESCENCE FOR SEED PRODUCTION IN *ARABIDOPSIS THALIANA* 65

A.I. INTRODUCTION 67
A.II. MATERIALS AND METHODS 69
A.III. RESULTS 74
A.III.1. The SAG12 mutation did not affect plant biomass but did influence yield under nitrogen depletion 74
A.III.2. Leaf area and leaf senescence are not different in Col and the sag12 mutant 75
A.III.3. Aspartic protease activity is greatly increased in the sag12 mutant under HN 76
A.III.4. Identification of aspartate proteases induced in sag12 76
A.IV. DISCUSSION 77
A.V. CONCLUSION 79

B. A NEW ROLE FOR SAG12 CYSTEINE PROTEASE IN ROOTS OF *ARABIDOPSIS THALIANA* 81

B.I. INTRODUCTION 83
B.II. MATERIALS AND METHODS 84
B.III. RESULTS 90
B.III.1. Root architecture and N uptake capacity are not affected in sag12 90
B.III.2. The SAG12 defect affects N allocation under LN conditions 90
B.III.3. Protein content is higher in roots of sag12 cultivated under LN condition 90
B.III.4. SAG12 is expressed in roots at the reproductive stage and the expression is higher under low nitrogen conditions 91
B.III.5. SAG12 is expressed in the root stele 91
B.III.6. Cysteine protease activity is lower in the sag12 root under LN conditions 91
B.IV. DISCUSSION 91
B.V. CONCLUSION 93

C. ETUDE DU RÔLE DES PROTÉASES À CYSTÉINE DANS L'ÉLABORATION DU RENDEMENT CHEZ LE COLZA (*BRASSICA NAPUS* .L) 95

D. OVEREXPRESSION OF A *BRASSICA NAPUS* L. WATER SOLUBLE CHLOROPHYLL BINDING PROTEIN (WSCP1) TO DELAY DARK-INDUCED LEAF SENESCENCE IN *ARABIDOPSIS THALIANA* 98

D.I. INTRODUCTION 100
D.II. MATERIAL AND METHODS 101
D.III. RESULTS 104
D.III.1. WSCP1 have the putative chlorophyll binding and protease inhibitor dual function. 104
D.III.2. The chlorophyll breakdown is delayed in mature leaves of pSAG12::WSCP1 lines. 105
D.III.3. The protein content is not difference whatever the genotype. 105
D.III.4. The serine proteases are less actives in WSCP1 over-expresser. 105
D.III.5. The WSCP1 is located in the chloroplast. 105
D.IV. DISCUSSION 106
D.V. CONCLUSION 107
D.VI. ANALYSES COMPLÉMENTAIRES 108

CHAPITRE V : DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 109

A. LES PROTÉASES À CYSTÉINE, UNE CLASSE DE PROTÉASES IMPLIQUÉE DANS LA REMOBILISATION DE L'AZOTE ASSOCIÉE À LA SÉNESCENCE 110

A.I. LA PROTÉASE SAG12 JOUE UN RÔLE IMPORTANT DURANT LA SÉNESCENCE EN CONDITION DE FORTE DISPONIBILITÉ EN N (HN) .. 111
A.II. LA PROTÉASE SAG12 JOUE UN RÔLE CRUCIALE DURANT LA SÉNESCENCE EN CONDITION DE FAIBLE DISPONIBILITÉ EN N (LN) 115

B. LES WSCPS, DES INHIBITEURS CAPABLES D'IMPACTER LA SÉNESCENCE 119

C. CONCLUSION 122

CHAPITRE VI : RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 124

CHAPITRE I

INTRODUCTION GÉNÉRALE

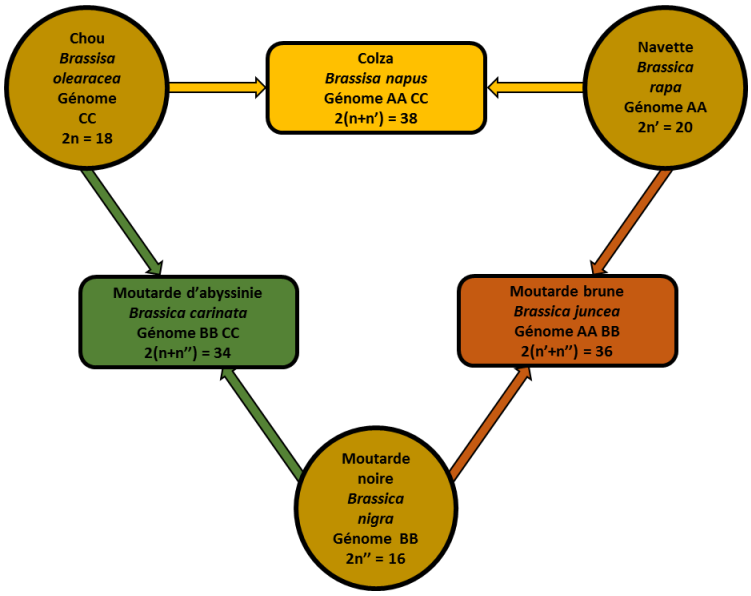


Fig. I.1. « Triangle de U » montrant les relations génétiques entre 6 espèces de brassicacées. A, B et C représentent les chromosomes de chaque génome et n leur nombre (d'après U, 1935).

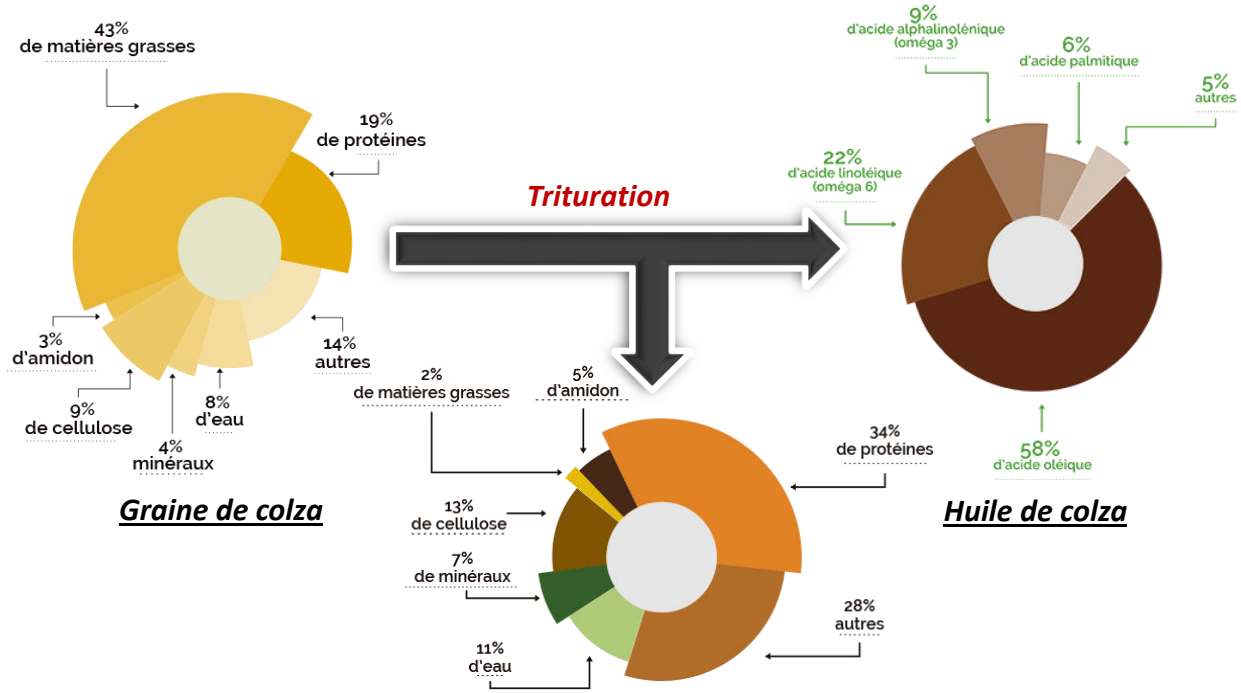


Fig. I.2. Composition des graines, de l'huile et du tourteau de colza (Source Feedbase ; terresunivia).

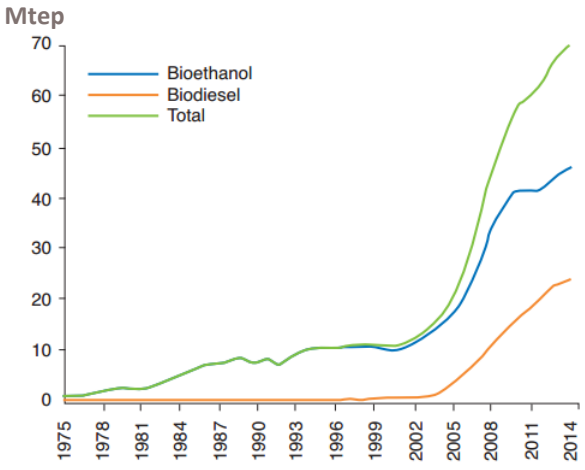


Fig. I.3. Consommation mondiale de biocarburant exprimée en millions de tonnes d'énergie primaire (Mtep) (Source : enerdata, SOeS).

Le colza (*Brassica napus* L.), une herbacée annuelle appartenant à la famille des brassicacées (anciennement crucifères) est issu d'un croisement naturel entre un chou (*Brassica oleracea* L.) et une navette (*Brassica rapa* L.) et possède donc un génome tétraploïde (U, 1935 ; **Fig. I.1**). L'origine précise de ce croisement n'est pas connue mais il se serait produit autour de la méditerranée, il y a plus de 7500 ans (Chalhoub *et al.*, 2014). Les premières preuves de l'utilisation du colza en tant que plante cultivée remontent à 2000-1500 av. J-C. où elle est mentionnée dans des textes sanskrits. On retrouve alors cette espèce citée tout au long de l'histoire humaine au travers de différents écrits grecs, romains ou chinois suggérant son adaptabilité à des zones géographiques et climatiques variées. En Europe, la culture du colza ne prend son essor qu'aux alentours de la fin du 18ème siècle, lorsque son huile est utilisée pour ses capacités lubrifiantes pour l'industrie mais également pour ses qualités pour l'alimentation humaine. Deux types de variétés de colza se différenciant notamment par la durée de leur cycle de culture sont principalement utilisés : le colza d'hiver, majoritairement cultivé en Europe (cycle de développement de 250-310 jours) et le colza de printemps, essentiellement cultivé au Canada, en Australie et en Asie (cycle de développement de 120-150 jours).

Le colza est principalement cultivé pour ses graines riches en huile (environ 43% de matière grasse) composées majoritairement d'acide oléique, linoléique (oméga 6), alpha-linoléique (oméga 3) et palmitique, mais aussi d'une grande diversité d'autres acides gras en proportions variables (**Fig. I.2**). Cette diversité est une richesse qui sera exploitée et améliorée par sélection variétale pour satisfaire la multitude de débouchés alimentaires et non alimentaires des huiles de colza. A titre d'exemple, depuis les années 2000, les différentes politiques agro-environnementales visant à diminuer l'utilisation d'énergie fossile dans un contexte de dérèglement climatique, ont conduit à une forte augmentation de la production de biocarburants en France et dans le monde (**Fig. I.3**). Ainsi, le biodiesel, élaboré à par estérification d'huiles végétales, est un biocarburant utilisé pur (B100 autorisé aux Etats-Unis seulement) ou mélangé (5 à 20%) à du gazole (B5 et B20), et est particulièrement intéressant puisqu'il permet de réduire considérablement les émissions de CO_2 des moteurs diesels. En France, le colza est actuellement la principale oléagineuse utilisée pour cet usage ce qui a entrainé une forte intensification de sa culture et une sélection de variétés de colza présentant des graines à haute teneur en huile (45%) afin d'optimiser la production de biodiesel. Même si cet objectif n'est pas encore atteint, la teneur moyenne en huile des graines de variétés de colza a cependant significativement augmenté puisqu'elle est passée de 42% en 1992 à plus de 43% en 2006 (Source : Gnis).

Par ailleurs, d'autres variétés ont été sélectionnées pour leur forte teneur en acide oléique (80%) et leur faible teneur en acide linoléique (3%) (HOLLi pour « high oleic/low linolenic ») permettant de

Fig. I.4. Evolution des cours (€/tonne) des tourteaux de colza et de soja. (source : GEB, institut de l'élevage)

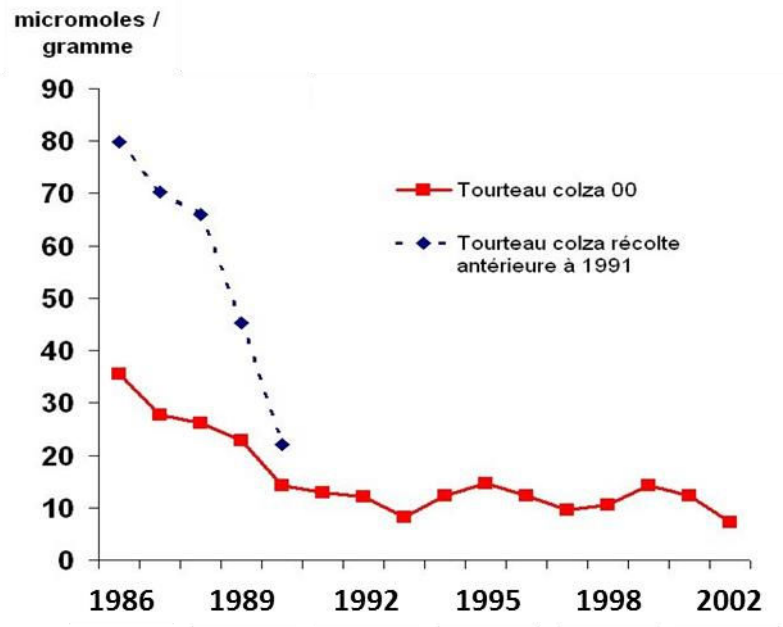


Fig. I.5. Evolution des teneurs en glucosinolates du tourteau de colza et plus spécifiquement du tourteau de colza « double zéro ». (source : Io7; Banque de données de l'alimentation animale)

fournir une matière première très compétitive pour les plateformes dédiées à la synthèse de polymères biosourcés.

Un autre secteur de valorisation importante de l'huile de colza est son utilisation dans l'alimentation humaine. En effet, la forte teneur en acide alpha-linoléique conjuguée à un faible ratio ω6/ω3, permet l'extraction d'une huile d'une excellente qualité pour la santé humaine. Ainsi, l'huile de colza serait particulièrement bénéfique en réduisant notamment les risques de maladies coronariennes et de certains cancers tel que le cancer du sein (Cho *et al.*, 2010; Subash-Babu et Alshatwi, 2018). Cependant, le colza accumule naturellement de l'acide érucique dont la proportion peut atteindre 45 à 50% de la fraction lipidique des graines (Hung S. *et al.*, 1977; Nesi *et al.*, 2008), un acide gras mono-insaturé supposé toxique chez l'animal. Cette forte accumulation naturelle d'acide érucique a conduit les sélectionneurs à créer dans les années 70 des variétés dites « simples zéro » (pour « zéro » acide érucique) qui produisent des graines présentant une proportion en acide érucique inférieure à 2% de la fraction lipidique.

Après trituration de la graine pour en extraire l'huile, un coproduit riche en protéines (environ 34%) appelé tourteau est obtenu (**Fig. I.2**). Les industriels se tournant de plus en plus vers une politique de valorisation des coproduits obtenus lors des processus de fabrication, le tourteau de colza, riche en protéines mais également en acides aminés essentiels (Lysine, Arginine et Cystéine), en minéraux (P et Ca) et en acide gras est utilisé pour l'alimentation animale (bovins, ovins, porcins et volailles). Son rapport qualité/prix supérieur à celui du soja pousse de plus en plus d'éleveurs à son utilisation (source terres Inovia) (**Fig. I.4**). Néanmoins, les graines de colza contiennent naturellement des glucosinolates, composés connus pour altérer l'appétence des tourteaux mais également pour provoquer des dérèglements physiologiques graves chez l'animal (Tripathi et Mishra, 2007). Pour répondre à cette problématique, dès les années 80, les sélectionneurs ont donc cherché des variétés de colzas avec une faible teneur en glucosinolates (inférieure à 20 µmol. g^{-1} contre 80 à 100 µmol.g^{-1} de graines dans les variétés classiques). Ainsi, des variétés dites « double zéro », combinant dans leurs graines une faible teneur en acide érucique et en glucosinolates (Double low : low erucic acid and low glucosinolate) sont apparues sur le marché (**Fig. I.5**).

En plus de ses nombreux débouchés économiques, le colza s'intègre dans un système cultural durable grâce à sa capacité à être une espèce dite Culture Intermédiaire Piège à Nitrate (CIPAN). En effet, sa forte capacité d'absorption de l'azote (plus de 200 kg de N.ha^{-1}.an^{-1}) en fait un bon candidat pour être utiliser en inter-culture et permettre une couverture des sols nus en hiver afin de limiter notamment le lessivage de nitrate et d'ammonium. De plus, la culture de colza alternée avec une culture de blé (rotation

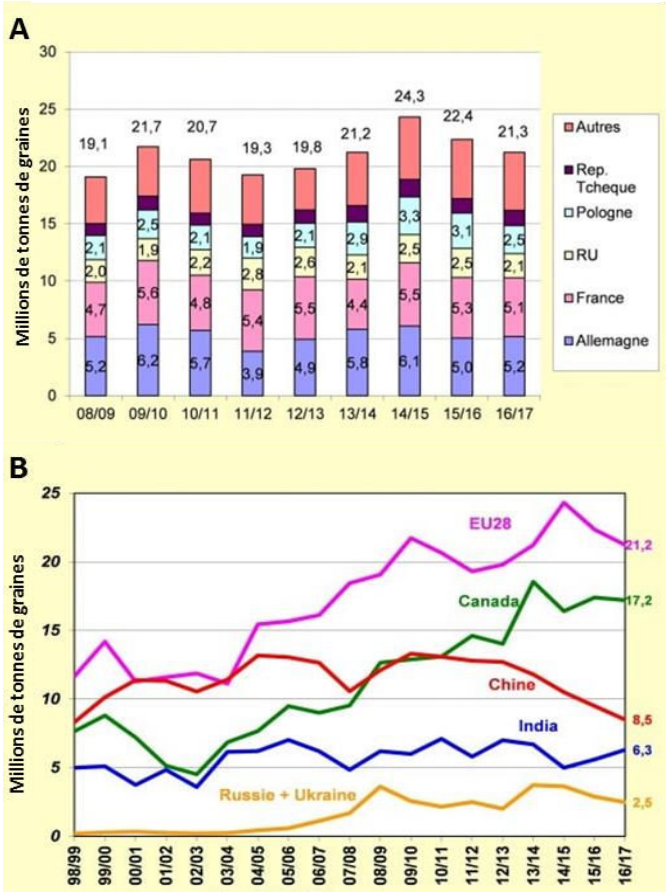


Fig. I.6. Evolution de la production de graines de colza au niveau européen (Europe des 28) entre 2009 et 2017 (A) et au niveau mondial entre 1999 et 2017 (B). Les données sont exprimées en millions de tonnes de graines (Source : FOP).

colza-blé) permet une amélioration de rendement du blé de 12% par rapport à deux cultures de blé successives (blé-blé). Par ailleurs, son caractère biofumigant, principalement dû à la diffusion dans le sol après enfouissement de composés soufrés, appelés isothiocyanates (ITC). De par leurs actions nématicide et fongicide, les ITC issus de la dégradation des glucosinolates sont de plus en plus considérés comme moyen de lutte biologique contre les stress biotiques.

Ces multiples usages expliquent pourquoi, depuis plusieurs dizaines d'années, les surfaces agricoles utilisées pour la culture du colza ne cessent d'augmenter au niveau mondial. En France métropolitaine, ces surfaces occupent aujourd'hui environ 13% des surfaces de grandes cultures et atteignent environ 1,403 millions d'hectares (source SSP[1]). L'augmentation combinée des rendements (liée notamment aux modifications des pratiques culturales et à l'amélioration variétale) a permis d'atteindre, en 2017, une production française de 5,1 Millions de Tonnes (MnT) de graines faisant de la France le 2^{e} producteur européen derrière l'Allemagne. Au niveau mondial, l'Europe (28 pays) avec une production de 21,8 MnT de graines de colza en 2017, est le premier producteur devant le Canada (21,3 MnT) et l'Inde (6 MnT) (source FOP[2]) (**Fig. I.6**).

Actuellement, comme pour toutes les espèces de grande culture, l'obtention de forts rendements grainiers du colza est intimement liée à l'apport de fortes doses de fertilisants (notamment azotés). A titre d'exemple, pour espérer une production grainière optimale, les variétés de colza actuellement cultivées et jadis sélectionnées sans prise en compte du ratio rendement/fertilisant, nécessitent des apports d'engrais azotés importants atteignant généralement 180-220 kg N ha^{-1} (Jackson, 2000). Toutefois, on considère que plus de la moitié de l'azote (N) mondial apportée aux différentes plantes de grande culture est perdue dans l'environnement (Rothstein, 2007) et ne bénéficient pas à la croissance des plantes (Lassaletta *et al.*, 2014). Outre ces problèmes environnementaux (lessivage, production de gaz à effet de serre), ces utilisations de fortes quantités d'intrants, dont le prix est indexé sur ceux du pétrole, représentent un coût économique majeur pour l'agriculteur (Singh, 2006).

Dans le cas précis du colza, cette forte dépendance aux intrants azotés est principalement due à une mauvaise valorisation de l'N puisqu'en dépit de ses fortes capacités d'absorption du N minéral, seulement 50 % de l'N absorbé est retrouvé dans les graines (Schjoerring *et al.*, 1995). De nombreux travaux ont permis de montrer qu'en réalité cette mauvaise valorisation de l'N serait essentiellement due à une faible efficience d'utilisation de l'N (EUtA) et plus particulièrement à une mauvaise efficience de

[1] Service de la Statistique et de la Prospective
[2] Fédération française des producteurs d'oléagineux et de protéagineux

remobilisation de l'N (ERA) lors de la sénescence foliaire avant le remplissage des grains (Malagoli *et al.*, 2005*a*; Girondé *et al.*, 2015*a*). Ce défaut de transfert d'N depuis les organes sénescents vers les graines a également pour conséquence un retour d'N au sol important lors de la chute des feuilles mortes (jusqu'à 140 Kg N. ha^{-1} ; Avice et Etienne, 2014).

Ainsi, les enjeux agro-environnementaux et économiques majeurs de la culture de colza consistent à maintenir, voire améliorer, le rendement grainier tout en limitant les doses d'intrants azotés. Afin de répondre à cet enjeu, les modifications des pratiques culturales, le développement d'outils de diagnostic du statut azoté et d'aide à la décision permettant un raisonnement de la fertilisation, et la sélection de variétés plus économes en intrants N constituent autant de stratégies envisagées pour améliorer le bilan agro-environnemental de la culture du colza. Dans ce contexte, une meilleure compréhension des processus de remobilisation de l'N associés à la sénescence foliaire constitue un préalable majeur à l'identification de déterminants moléculaires utilisables pour la sélection de variétés présentant une ERA optimisée.

Bénéficiant d'une allocation du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, mes travaux de recherche doctorale sont inscrits pleinement dans le programme Investissement Avenir RAPSODYN[3] (2012-2019) qui vise à optimiser la teneur et le rendement en huile du colza cultivé sous faibles apports d'intrants azotés. Dans ce contexte, ce travail de thèse a principalement consisté à étudier les systèmes protéolytiques impliqués dans la remobilisation de l'N et à mieux appréhender leur importance durant la sénescence foliaire et la production de graines.

Après une synthèse bibliographique des connaissances relatives au colza et à la gestion de l'N, abordant notamment plus en détails les mécanismes et principaux acteurs impliqués dans la remobilisation de l'N au cours de la sénescence foliaire, un chapitre décrivant les méthodes et dispositifs expérimentaux utilisés aux cours de ce travail doctoral sera présenté. Une présentation des résultats sera ensuite proposée sous la forme de 3 articles. Ces résultats feront ensuite l'objet d'une discussion générale ouvrant sur de futures perspectives de recherches.

[3] ANR-11-BTBR-004 RAPSODYN – Investments for the future : Optimisation of the RAPeSeed Oil content anD Yield under low Nitrogen input

CHAPITRE II

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

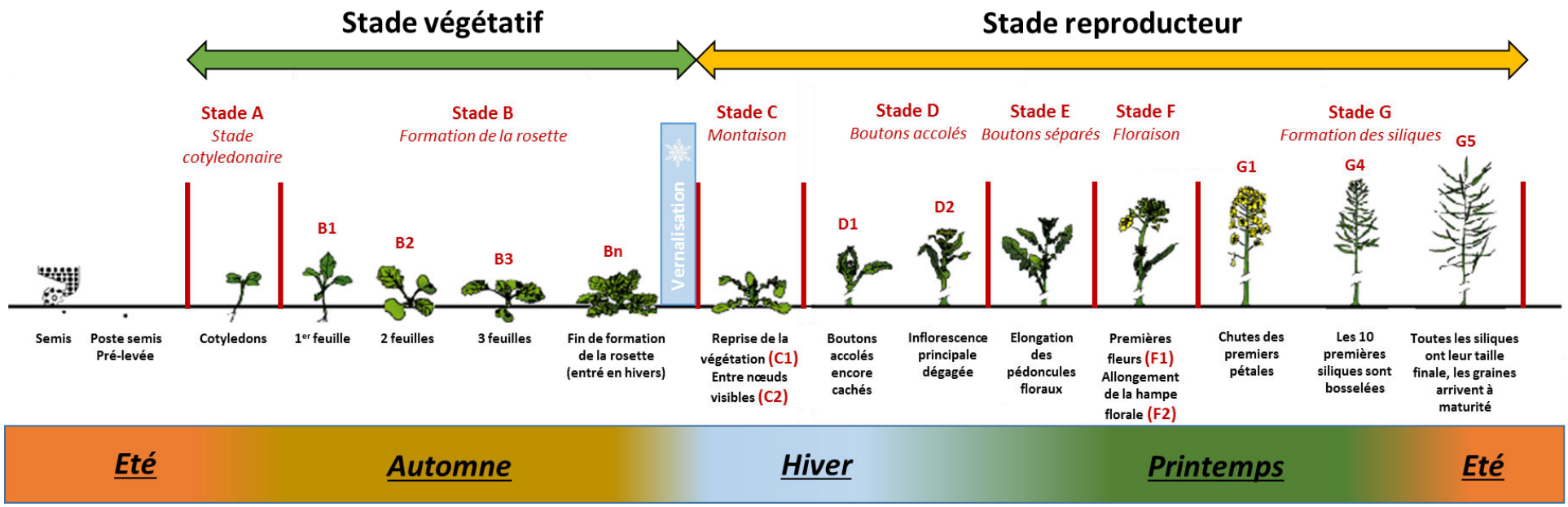


Fig. II.1. Les différents stades repères (Stades A à G) du développement du colza d'hiver. (source: terresinovia ; proléa)

A. Le colza d'hiver et la nutrition azotée

L'azote (N) est le 4^{e} élément essentiel après le carbone (C), l'oxygène (O) et l'hydrogène (H). Il va permettre la formation d'une multitude de molécules nécessaires au bon fonctionnement métabolique des plantes. On le retrouve au sein des acides nucléiques qui permettront la formation de l'ADN et de l'ARN, des acides aminés constituant les peptides et les protéines et de certains métabolites secondaires (glucosinolates, glycosides cyanogéniques…) mais aussi de pigments tels que les chlorophylles. Le colza est une oléoprotéagineuse particulièrement exigeante en N, absorbé préférentiellement sous forme de nitrate (plante nitrophile). En effet, des travaux ont montré que la production d'un quintal de graines nécessite l'absorption de 6 kg d'N contre seulement environ 3,5 Kg pour le blé (Rathke *et al.*, 2006; Arvalis). Ainsi, au cours de son développement, les apports nécessaires en intrants azotés afin de maintenir un rendement optimal sont de l'ordre de 180 à 220 kg.ha^{-1} (Jackson, 2000).

A.I. Gestion de l'azote au cours du développement du colza d'hiver

Le colza a une gestion très hétérogène de l'N au cours de son développement puisque ses besoins, ses capacités d'absorption et sa valorisation de l'N sont très dépendants du stade de développement considéré. Le développement du colza d'hiver s'étend sur environ douze mois répartis sur deux années civiles (d'août de l'année n à fin juillet de l'année n+1) et comprend sept étapes principales (**Fig. II.1**). Après le semis, les cotylédons apparaissent (stade A) suivis des premières feuilles vraies pour constituer la rosette (stade B) dont la fin de formation à lieu en début d'hiver (décembre), période durant laquelle les plantes vont être exposées aux basses températures nécessaires à leur vernalisation. Au printemps, les températures plus clémentes vont permettre la reprise de végétation et l'apparition de la tige (stade C, montaison) et des boutons floraux d'abord accolés (stade D) puis séparés (stade E) et enfin totalement fleuris (stade F). Cette période précède le stade G qui correspond à la formation des siliques et des graines et qui s'étend généralement de mars à fin juillet (**Fig. II.1**).

A.I.1. Du semis à la reprise de végétation (stade C)

Le colza d'hiver est semé fin aout-début septembre à une densité de 1,2 à 3 kg de graines ha^{-1} permettant d'avoir environ 20 à 30 plantes par m². Après germination, la plante vit sur les réserves de la graine jusqu'à la mise en place d'un système racinaire (la radicelle) et des 2 premières feuilles cotylédonaires (stade A) qui permettent respectivement à la plante d'absorber les nutriments du sol et de réaliser la photosynthèse. A partir de ce stade, la croissance de la plante sera favorisée par l'assimilation

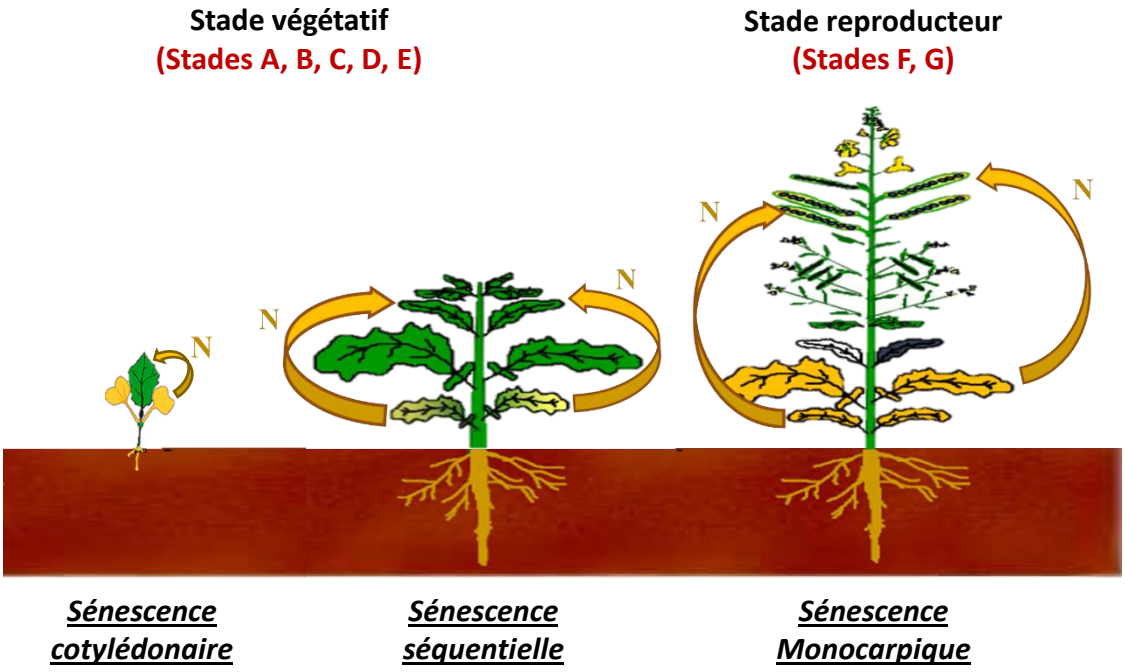


Fig. II.2. **Les différents types de sénescence au cours des principaux stades de développement du colza.**

et la synthèse de composés carbonés et azotés qui vont permettre notamment, le développement du système racinaire et l'émergence progressive d'une vingtaine de feuilles dites « vraies » qui constitueront la rosette (stade B) (**Fig. II.1**). Au stade rosette, les plantes présentent un système racinaire radiculaire en pivot.

Durant la période automnale, le colza présente de fortes capacités d'absorption de l'N du sol, bien supérieures à celles d'autres plantes de grande culture telles que les Poaceae et les légumineuses (Lainé *et al.*, 1993). Cette forte absorption d'N minérale (pouvant aller jusqu'à 250 kg ha^{-1}) favorise la synthèse de protéines qui pourront, aux niveaux racinaire (pivot) et foliaire, constituer des réserves potentiellement mobilisables au moment de la reprise de végétation printanière. Chez le colza, l'absorption et l'assimilation d'N durant cette période n'est pas un facteur limitant du rendement puisqu'il a été montré qu'un apport supplémentaire d'N minéral n'avait aucun effet sur le rendement grainier obtenu en fin de cycle (Colnenne *et al.*, 1998). En conséquence, afin d'éviter les pertes d'azote nitrique (par lessivage notamment), la directive nitrate 91/676/CEE (adoptée en 1991, dernier décret le 15 mars 2015) interdit l'apport d'engrais azoté sous forme minérale sur les parcelles de colza du 1er septembre au 15 janvier. En plus de cette forte absorption d'N, un recyclage de l'N endogène à lieu au cours du développement végétatif. Ainsi, si la demande en N des organes en croissance est supérieure à l'offre (*i.e.* à l'azote absorbé), une mobilisation d'azote racinaire est possible *via* la dégradation de protéines et notamment d'une Vegetative Storage Protein de 23 KDa se trouvant dans le pivot (Rossato *et al.*, 2001). Par ailleurs, au cours de la croissance de la plante, les feuilles les plus âgées basculent séquentiellement dans un stade ultime de développement appelé sénescence. Cette sénescence s'accompagne de nombreuses modifications physiologiques et moléculaires dont notamment la dégradation des protéines foliaires par de nombreuses protéases. Les produits de dégradation (peptides et acides aminés) sont ainsi recyclés au profit des organes en croissance, essentiellement des jeunes feuilles lors du stade végétatif (stades A, B, C, D et E) (**Fig. II.2**). Toutefois, il est désormais acquis que ce processus de recyclage associé à la sénescence foliaire n'est pas optimal puisque, durant le développement végétatif, il a été montré que les feuilles chutaient avec des teneurs en azote résiduel élevées de l'ordre de 2 à 4,5% de leur matière sèche (Triboi-Blondel *et al.*, 1988; Dejoux *et al.*, 2000). Ce fort retour d'azote au sol (pouvant atteindre 140 kg ha^{-1}) met en lumière la mauvaise efficience d'usage de l'N par le colza et notamment sa mauvaise capacité à remobiliser cet élément (Girondé *et al.*, 2015*a*). Outre les conséquences environnementales, il a également été montré que cette perte d'N affecte négativement le rendement de la culture. Ainsi, en utilisant un modèle mécanistique, Malagoli *et al.*, (2005*b*) ont montré qu'une diminution des teneurs en N des feuilles chutées au cours du stade végétatif à des valeurs proches de 1% permettrait d'augmenter le rendement de la culture d'environ 30%.

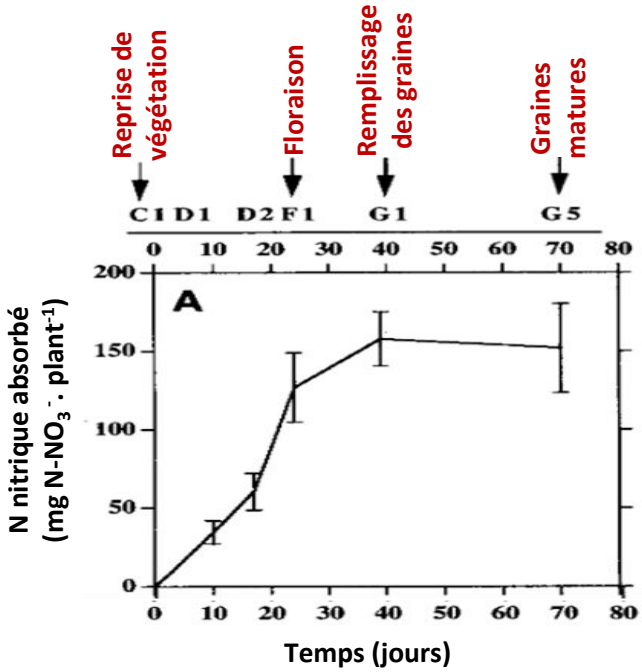


Fig. II.3. Quantité cumulée d'N nitrique absorbé entre les stades C1 (reprise de végétation) et G5 (graines matures) (adapté de Rossato *et al.*, 2001).

Dose à apporter (kg/ha)	Reprise de végétation (stades C1-C2)	Début montaison (stades C2-D1)	Boutons accolés (stades D1-D2)	Boutons séparés (stade E)
< 100			< 100	
100 à 170		60 à 80	40 à 90	
> 170	40 à 60	50 et +		40 à 60

Fig. II.4. Préconisation de fractionnement des apports d'azote lors de la reprise de végétation (source : Terresinovia).

Durant la période hivernale, la chute des températures provoque un ralentissement puis un arrêt de la croissance du colza qui rentre dans une période de repos végétatif lorsque la plante est exposée pendant au moins 5 jours consécutifs à une température moyenne journalière inférieure à 5 °C. Durant cette période, le colza pourra résister à des températures allant jusqu'à -20 °C sans que cela affecte ni sa croissance, ni son rendement grainier (Merrien et Pouzet, 1988). Cette période de repos végétatif induite par le froid, appelée période de vernalisation, est nécessaire pour que le colza d'hiver initie sa floraison au printemps (Chouard, 1960).

A.I.2. De la reprise de végétation (stade C) à la fin de la montaison (stade E)

La reprise de végétation du colza à lieu en sortie d'hiver lorsque la température moyenne journalière est supérieure à 5°C, même si certains auteurs considèrent que cette reprise de croissance est d'avantage contrôlée par la date de semi que par l'augmentation des températures (Tittonel *et al.*, 1988). Cette reprise de végétation s'accompagne d'une forte augmentation de la surface foliaire qui se prolongera jusqu'au début de la floraison (stade F1). Dans le même temps, la montaison (émergence et élongation de de la tige ; Stades C1-C2) s'initie et se poursuit par l'apparition des boutons floraux puis par la floraison (stades D1 à F) (**Fig. II.1**).

Durant ces différents stades qui constituent la phase reproductrice du colza, on observe que l'absorption du nitrate reste élevée de la reprise de la végétation (stade C1) jusqu'au début de la floraison (stade F2 ; Rossato *et al.*, 2001) (**Fig. II.3**). Durant cette période, la forte augmentation de biomasse est associée à une forte demande en N qui est inversement proportionnelle à la quantité d'N absorbée durant la période automno-hivernale. C'est en général durant ces stades de développement printaniers que des apports d'intrants azotés sont réalisés afin de complémenter l'azote du sol. La dose d'N apportée dépendra d'une part, de la quantité absorbée durant l'automne et d'autre part, d'autres paramètres tels que la nature du sol, les apports organiques réalisés ou la présence de plantes compagnes telles que des légumineuses (Jamont *et al.*, 2013). Par ailleurs, de plus en plus d'outils de diagnostic du statut azoté des plantes visant à optimiser le pilotage de la fertilisation N (pour plus de détails voir § A.II) sont désormais disponibles et permettent de mieux ajuster la dose d'N en fonction des besoins réels de la culture au printemps. D'une manière générale, cette dose d'N est comprise entre 100 et 170 kg N ha^{-1} an^{-1} et est apportée en 2 ou 3 apports fractionnés (source : terres Inovia) (**Fig. II.4**).

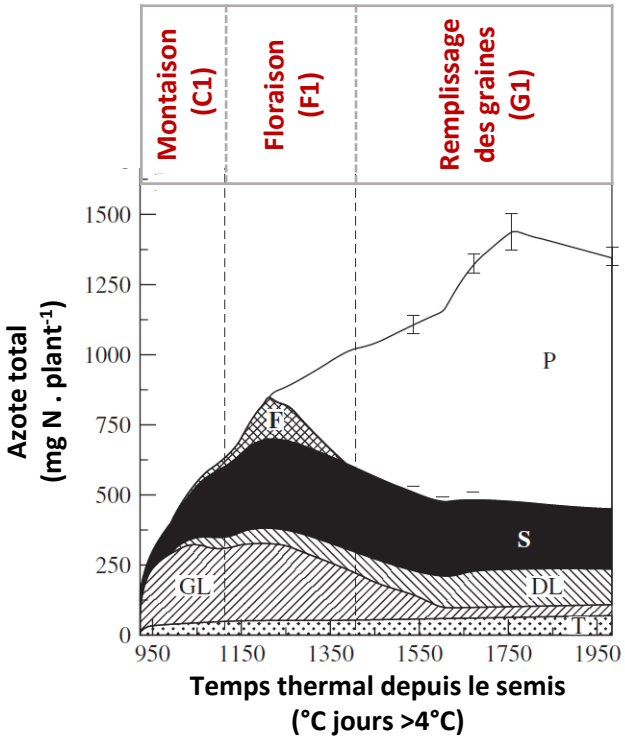


Fig. II.5. Evolution des quantités d'azote total du colza d'hiver (*Brassica napus* L. ; Capitol) dans les différents organes du colza. T: Racine pivotante, **GL:** Feuilles vertes, **DL:** Feuilles mortes, **S:** Tiges, **F:** Fleurs, **P:** Siliques (adapté de Malagoli *et al*., 2005a).

A.I.3. De la floraison (stade F) à la récolte des graines (Stade G)

Chez le colza, la floraison qui dure 4 à 6 semaines démarre fin mars lorsque le photopériodisme est assez long (stades F1 et F2). La fécondation des fleurs, principalement par autogamie, donne naissance aux siliques qui, après une durée de maturation de 6 à 7 semaines, renferment en moyenne 10 à 15 graines qui pèseront à maturité entre 3,5 et 5 mg par graine (stade G1 à G5) et auront un taux d'humidité inférieur à 15% pour être récoltées.

La formation des premières siliques (stade G1) coïncide avec une diminution de l'absorption racinaire d'N (Rossato *et al.*, 2001) (**Fig. II.3**) intervenant alors que la force puits des graines est maximale. Durant cette période, l'essentiel de l'N nécessaire au remplissage des graines provient de l'N endogène remobilisé à partir des tissus végétatifs et plus particulièrement des tiges, des feuilles et du pivot (Rossato *et al.*, 2001; Malagoli *et al.*, 2005*a*) (**Fig. II.5**). Cette remobilisation massive est associée à un processus de senescence généralisée que l'on qualifie de monocarpique et qui permet une remobilisation d'N à partir de tous les organes de la plante au profit des graines (**Fig. II.2**). Contrairement à ce qui a pu être observé lors de la sénescence séquentielle, la mobilisation d'N associée à la sénescence monocarpique est considérée comme particulièrement efficace puisque la teneur en N des feuilles chutées au cours de cette période est proche de 1% de la matière sèche, c'est-à-dire une valeur correspondante à l'azote structural difficilement mobilisable. Par conséquent, contrairement à ce qui est observé lors de la sénescence séquentielle, l'efficience de remobilisation de l'N durant la sénescence monocarpique du colza est considérée comme étant quasi optimale (Rossato *et al.*, 2001; Malagoli *et al.*, 2005*a*).

A.II. Les outils de pilotage de la fertilisation N

L'optimisation de la fertilisation azotée, c'est-à-dire l'apport d'intrants azotés au bon moment et à la bonne dose, constitue un enjeu majeur pour améliorer le bilan agro-environnemental de la culture de colza tout en garantissant une stabilité, voire une meilleure rentabilité financière à l'agriculteur. Pour cela, il est nécessaire de connaitre les besoins réels en N de la plante à ses différents stades de développement afin de pouvoir lui apporter de manière précise la dose d'intrant N nécessaire à sa croissance. Pendant de nombreuses décennies, les besoins unitaires azotés importants ont conduit les agriculteurs à utiliser des doses d'engrais importantes et déterminées le plus souvent de manière empiriques afin d'assurer des rendements élevés. Ainsi, les doses d'intrants azotés apportées pouvaient atteindre jusqu'à 250 kg N ha^{-1} pour le colza et avoir des conséquences sur l'acidification des sols, l'eutrophisation pouvant aller jusqu'à une dystrophisation des milieux aquatiques et l'augmentation de la pollution par les gaz à effet de serre

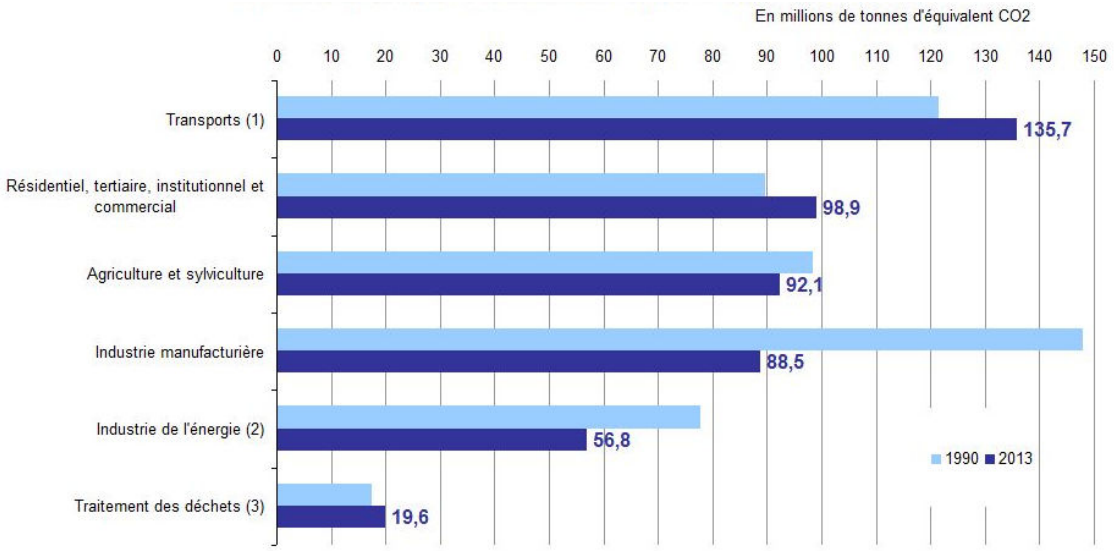


Fig. II.6. Production de gaz à effet de serre (en millions de tonnes d'équivalent CO_2) par secteur d'activité en France au cours des années 1993 et 2013 (Source : Citepa).

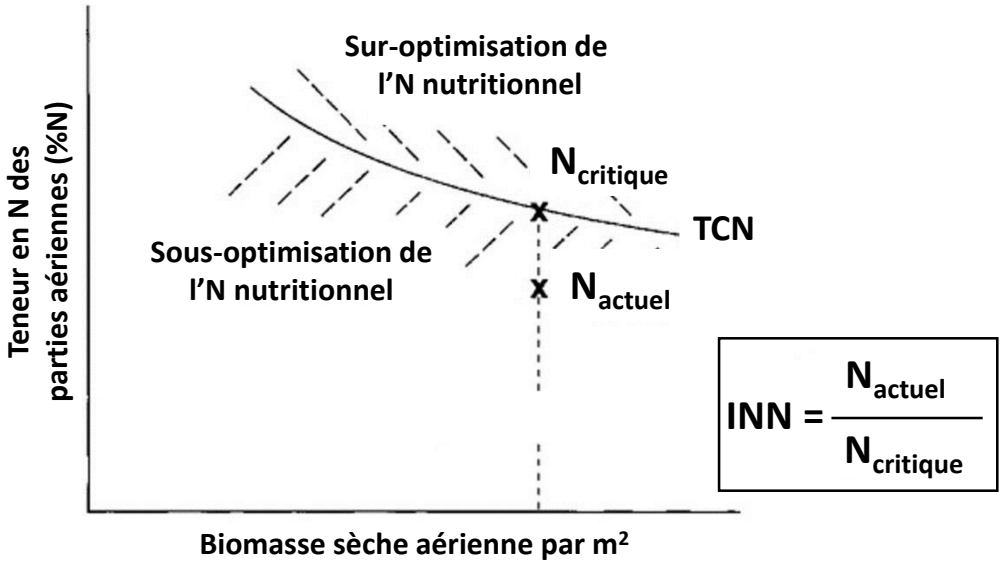


Fig. II.7. Relation entre la teneur en azote dans la matière sèche aérienne (%N) et la biomasse sèche aérienne par m² permettant le calcul de l'indice de nutrition azoté (INN) en référence à la teneur critique en azote du colza (TCN) calculé d'après l'équation proposée par Colnenne *et* al., (1998) (adapté de Lemaire et *al.,* 1989).

(N_2O) (**Fig. II.6**). Depuis quelques décennies, la prise de conscience du respect de l'environnement a conduit de nombreuses organismes et instituts tels que terres Inovia, Arvalis, le COMIFER[4], les sélectionneurs, l'INRA, pour n'en citer que quelques-uns, à développer des programmes de recherche visant à trouver des solutions permettant de raisonner cette fertilisation. Actuellement, ces solutions passent notamment par l'analyse du statut azoté des plantes *via* l'utilisation d'outils d'aide à la décision (OAD), par l'amélioration des modes de fertilisation, l'utilisation d'engrais « éco-inovants » mais également par la mise en place de nouvelles pratiques culturales dites durables.

A.II.1. Les méthodes de mesure du statut azoté

L'évaluation du statut azoté fait appel à des outils appelés « outils d'aide à la décision » (OAD) qui viennent en aide à l'agriculteur pour ajuster au mieux l'apport azoté en fonction des besoins réels de la plante en vue d'obtenir un rendement optimal. Actuellement, il existe des méthodes dites destructives où un prélèvement d'échantillons sur la parcelle sera nécessaire pour réaliser des analyses (biochimiques ou élémentaires) ultérieures en laboratoire, et des méthodes dites non destructives pouvant être réalisées directement et faisant généralement appel à des appareils de mesures optiques (Muñoz-Huerta *et al.*, 2013).

- <u>Les méthodes d'évaluation destructives :</u>

L'indice de nutrition azoté (INN) est un indice qui caractérise l'état de nutrition d'une parcelle grâce au rapport entre la teneur critique en azote (TCN) et la teneur en N (%N) des parties aériennes d'une culture (Lemaire *et al.*, 1989). La TCN correspond à la teneur minimale en N des parties aériennes permettant d'atteindre une croissance maximale (Colnenne *et al.*, 1998) (**Fig. II.7**).

D'autres méthodes d'aide au pilotage de la fertilisation azotée sont basées sur les mêmes principes de calcul que ceux utilisés pour l'INN (**Fig. II.8**). L'une des plus connues est la réglette azote colza®, mise au point par Terres Inovia (anciennement CETIOM[5]) en 1994, et régulièrement mise à jour. Son utilisation, basée sur la détermination de biomasse (aérienne) produite sur un mètre carré et d'informations complémentaires fournies par l'agriculteur (type de sol, précédent cultural, apports organiques fournis à la culture…), permet d'estimer (gratuitement) la dose d'intrants azotés à fournir lors de la reprise de végétation de la plante pour atteindre un objectif de rendement donné.

[4] Le Comité français d'étude et de développement de la fertilisation raisonnée
[5] CEntre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains

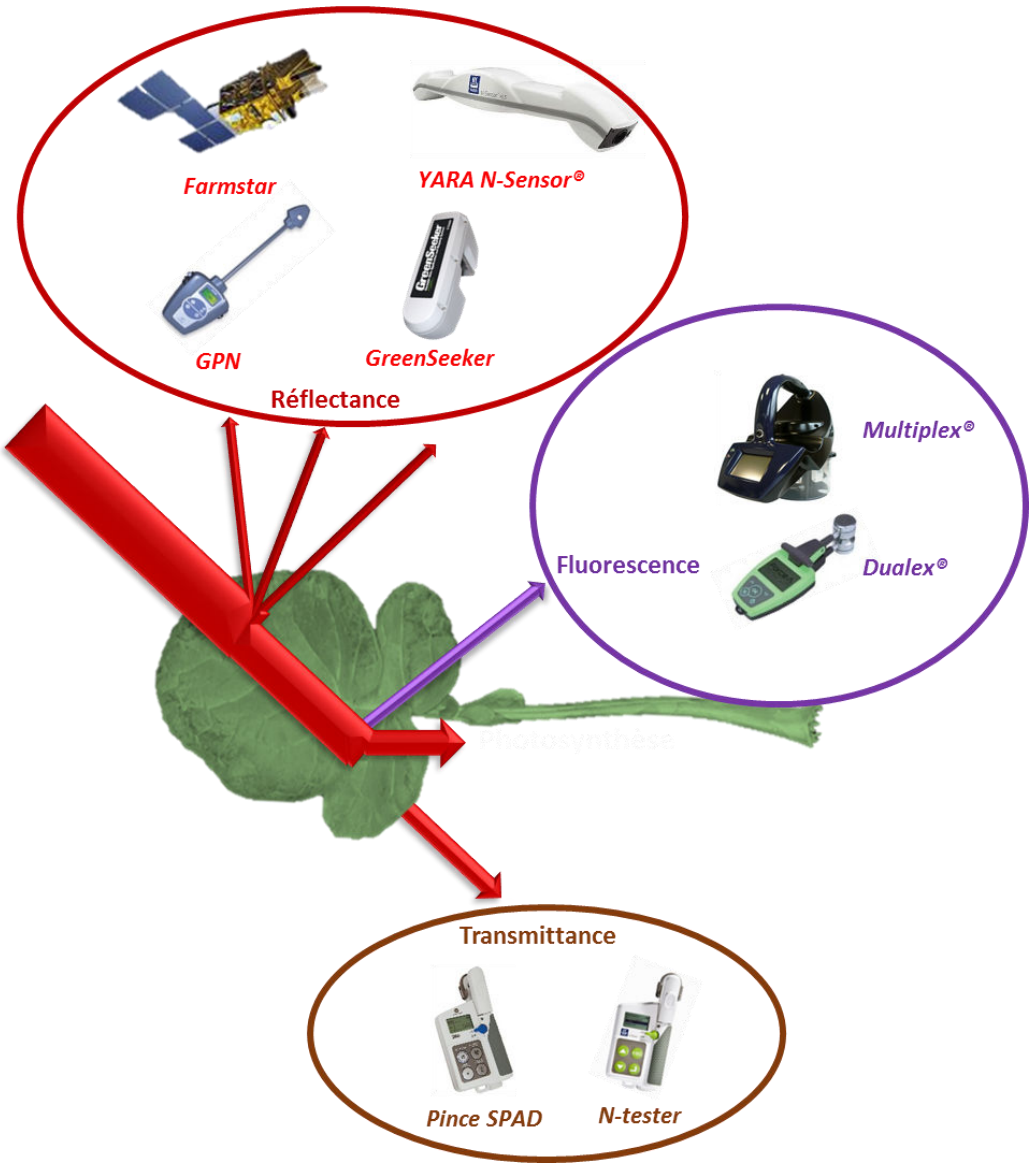


Fig. II.8. Les différents principes de mesures optiques utilisés en agronomie (Réflectance, Transmittance, Fluorescence) et appareils associés.

- Les méthodes d'évaluation non destructives :

Une application smartphone (YARA Image IT) basée sur les principes de la réglette azote® avec une collaboration entre Terres Inovia et YARA a été mise au point afin de réaliser un diagnostic de façon non destructif. En effet, elle permet, à partir d'une photographie de parcelle, d'évaluer la biomasse et la quantité d'azote absorbée par la culture en entrée et en sortie d'hiver grâce à une analyse de pixels verts.

Les appareils optiques tels que la pince SPAD (SPAD-502 model, Minolta) et le N-tester (YARA) permettent également de calculer un indice, corrélé à la teneur en chlorophylles, et dont le calcul est basé sur la mesure de la transmittance de radiations lumineuses à 650 et 940 nm à travers un tissus foliaire (Uddling *et al.*, 2007) (**Fig. II.8**). L'appareil photosynthétique (antenne collectrice de photons, photosystèmes I et II, chaînes de transfert des électrons, RuBisCO…) représentant plus de la moitié du N dans une feuille (Evans, 1989), le niveau de chlorophylles est donc étroitement lié à la teneur en N des feuilles. Sur la base de ce postulat, l'indice de transmittance peut alors lui-même être corrélé à une teneur en N foliaire (Juśko et Kościk, 2002). Cependant, la mesure SPAD étant réalisée de manière localisée sur le limbe d'une feuille (surface de mesure 2 mm x 3 mm), elle n'est pas toujours représentative du statut en N de la feuille entière et encore moins d'une plante ou d'une parcelle entière.

Une large gamme d'appareils (GPN, GreenSeeker, le Yara N-sensor), dont certains peuvent être embarqués sur un véhicule agricole ou sur un drone, réalisent des mesures sans contact basées sur le principe de réflectance du couvert végétal (**Fig. II.8**). Ces appareils optiques ont leurs propres sources de production de lumière, ce qui limite les interactions avec la lumière du soleil. L'appareil calcule un indice de réflectance qui correspond au ratio entre l'énergie lumineuse émise par l'appareil et l'énergie lumineuse réfléchie par le couvert végétal. L'indice de réflectance va permettre de calculer un indice de végétation (NDVI : Normalized Difference Vegetation Index ; Rouse, 1974) qui est représentatif de la teneur en chlorophylles, de la biomasse et donc du statut N de la culture. Aujourd'hui, ces appareils sont particulièrement bien adaptés aux couverts végétaux homogènes et sont en cours d'amélioration pour les couverts végétaux plus hétérogènes tels que les couverts de colza. Par exemple, *via* Farmstar (service d'analyses de parcelles par satellites), il est possible d'établir une cartographie qui renseigne sur le bilan de biomasses en entrée et en sortie d'hiver et de fournir des préconisations sur les doses de fertilisants azotés à apporter à la parcelle. Cependant, les mesures de réflectance représentent un coût non négligeable, d'autant qu'elles nécessitent une parcelle de référence sur-fertilisée en N. De plus, ces appareils présentent l'inconvénient d'être tout de même sensibles aux conditions météorologiques puisqu'une fine couche de nuages suffit, par exemple, à perturber les mesures.

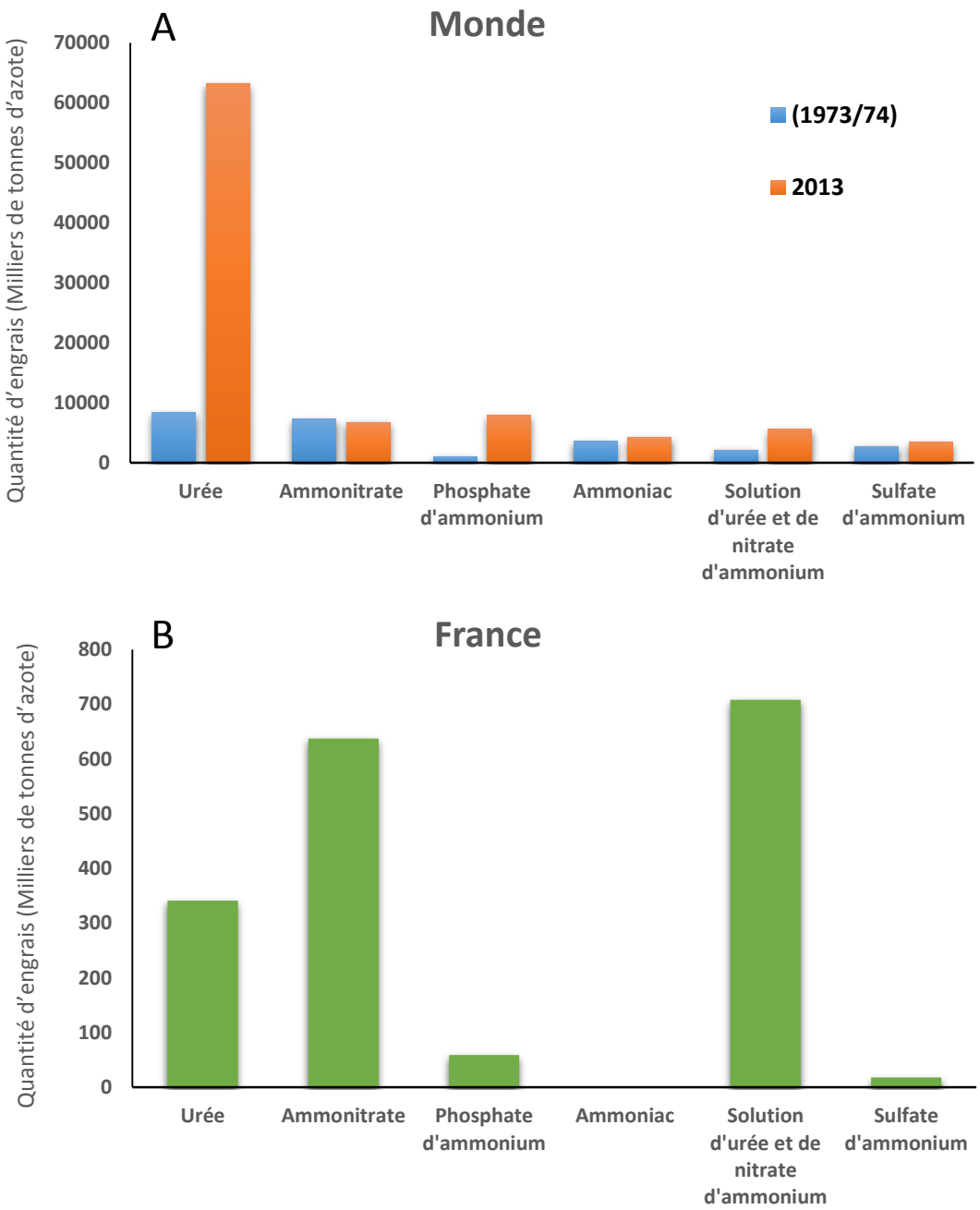


Fig. II.9. Quantité des différents types d'engrais azotés (milliers de tonnes d'azote) consommée dans le monde en 1973/74 et 2013 (A) et en France en 2013 (B) (Source : FAO, ONU pour l'alimentation et l'agriculture).

D'autres appareils développés par la société Force-A, tels que la pince Dualex® et le Multiplex®, (**Fig. II-8**) sont des fluorimètres portables utilisables en laboratoire ou sur le terrain. Comparés aux autres appareils, ils présentent la particularité de s'affranchir des variations des conditions météorologiques et de réaliser des mesures instantanées et non destructives de divers composés tels que les chlorophylles et les polyphénols (Flavonols et anthocyanes) à différentes échelles (feuille individuelle, ensemble des feuilles d'une plante ou couvert végétal). Chez de nombreuses espèces, la variation de fluorescence liée à ces composés et plus particulièrement aux chlorophylles et aux flavonoles, permettent le calcul d'un indice, appelé « Nitrogen Balance Index » (NBI) (Cartelat *et al.*, 2005), et dont la valeur permet d'évaluer le statut N des plantes. Mes travaux de recherche réalisés dans le cadre de mes stages de Masters 1 et 2R et à l'occasion d'un contrat d'assistant ingénieur sur le programme RAPSODYN, ont permis de montrer que la mesure de cet indice NBI (au niveau foliaire, plante entière ou d'un couvert végétal) permet d'estimer le statut N du colza. A l'issue de ces travaux, un nouvel indice plus pertinent (confidentiel, étude de brevetabilité en cours) se corrélant mieux à l'INN a été mis au point avec une validation au champ actuellement en cours.

Enfin, d'autres technologies, basées sur la spectroscopie infrarouge (NIRS : Near InfraRed Spectroscopy), la spectroscopie de plasma induit par laser (LIBS : Laser Induced Breakdown Spectroscopy) ou la résonance magnétique nucléaire (RMN; Sorin *et al.*, 2015) sont également en cours de développement et paraissent très prometteuses pour diagnostiquer le statut N d'une plante ou d'un couvert végétal.

A.II.2. Les différentes formes d'intrants azotés.

Les besoins en N du colza sont particulièrement importants puisqu'on considère qu'il faut environ 60 g d'N absorbés pour produire un kilogramme de graines (Rathke *et al.*, 2006) contre seulement 20 à 30 g pour le blé tendre par exemple. L'N est donc un des éléments nutritifs majeurs pour l'élaboration du rendement et l'on considère que c'est seulement au-delà de 330 unités d'N (une unité = 1kg de N. ha^{-1}), qu'il n'est plus limitant pour le rendement. Une partie de cet N proviendra des ressources du sol et une autre partie sera apportée par l'agriculteur sous formes d'intrants azotés minéraux (ammoniac et nitrate) et/ou organiques (urée, résidus de culture ou déjections animales) (**Fig. II.9**).

Les plantes absorbent majoritairement les formes minérales d'N et peuvent avoir des affinités différentes pour l'une ou l'autre de ces formes. Le colza qui est qualifié de plante nitrophile, privilégie l'absorption d'N nitrique à l'azote ammoniacal (Arkoun *et al.*, 2012). Quelle que soit la forme d'N minérale considérée, des pertes d'N par volatilisation ou lixiviation sont généralement observées. Ces pertes, outre

le fait qu'elles diminuent la quantité d'N disponible pour la croissance du végétal, sont également à l'origine de pollutions environnementales non négligeables. L'ammonium (NH_4^+) absorbé sur le complexe argilo-humique ou la solution du sol par exemple, peut être volatilisé en sa forme gazeuse, *i.e.* l'ammoniac (NH_3) ou encore être à l'origine d'une production de protoxyde d'azote (N_2O, gaz à effet de serre) sous l'action de bactéries aérobies du sol à activité nitrifiante. Contrairement à l'ammonium, le nitrate est un élément très soluble ce qui favorise son transport par l'eau du sol jusqu'aux racines mais facilite aussi sa lixiviation. Par ailleurs, le nitrate peut également être à l'origine de la production de N_2O *via* l'activité dénitrifiante (anaérobie) de bactéries pédosphériques. Enfin, l'urée, un des engrais organiques les plus utilisés dans le monde (**Fig. II-9** ; FAO[6]). L'urée peut être directement absorbée par les plantes grâce à des transporteurs racinaires dédiés (AtDUR3 par exemple chez *Arabidopsis thaliana*). Toutefois, dans la plupart des cas et notamment dans le cas de cultures de colza, plante qui absorbe très peu l'urée (Arkoun *et al.*, 2012), cette molécule est rapidement minéralisée par des microorganismes du sol (bactéries avec activité uréase) en ammonium qui, à son tour, pourra être volatilisé et/ou générer du nitrate. Ainsi, les pertes d'N liées à l'urée se feront par le biais de la volatilisation ammoniacale, le lessivage de nitrate et la production de N_2O. Pour éviter ces pertes, il est possible de coupler les apports d'engrais uréiques avec des inhibiteurs d'uréases tel que le N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (NBTT) qui permet notamment de diminuer la volatilisation ammoniacale de 17% (Arkoun *et al.*, 2012).

A.III. L'Efficience d'Usage de l'Azote (EUA) chez le colza

Même si l'optimisation des pratiques culturales et la mise au point d'outils de diagnostic permettant d'évaluer le statut azoté constituent des solutions intéressantes pour aider au pilotage de la fertilisation azotée, et donc diminuer les pertes et les pollutions environnementales, d'autres stratégies centrées sur l'optimisation de l'efficience d'usage de l'azote (EUA) du colza constituent également des leviers potentiels d'amélioration. En effet, en dépit de fortes capacités d'absorption d'azote nitrique, le colza se caractérise par une faible EUA (Schjoerring *et al.*, 1995; Avice et Etienne, 2014). Actuellement, l'amélioration de l'EUA du colza fait appel à différentes stratégies telles que la sélection ou la création de variétés de colza à forte EUA ou encore la mise aux point de fertilisants éco-innovants capables de stimuler l'EUA. Quelle que soit la stratégie considérée, la compréhension des mécanismes gouvernant cette EUA constitue un préalable à son amélioration potentielle.

[6] Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

Tableau II.1. Indices agronomiques permettant d'évaluer le rendement et la valorisation de l'azote du sol et des fertilisants par les plantes. N_{app}: N total apporté ; N_F: N apporté par fertilisation ; M: masse (adaptés de Good *et al*., 2004 ; Dawson *et al.,* 2008 ; Masclaux-Daubresse *et al.,* 2010*).*

Abréviations	Dénomination	Formule	Unité
EAbA	Efficience d'absorption de l'azote	N total / N_{app}	$Kg.kg^{-1}$
EUtA	Efficience d'utilisation de l'azote	Rendement / N total	$Kg.kg^{-1}$
EUA	Efficience d'usage de l'azote	EAbA x EUtA = rendement / N_{app}	$Kg.kg^{-1}$
HI	Harvest index (indice de récolte)	M graines / M totale	$Kg.kg^{-1}$
NHI	Nitrogen harvest index (indice de récolte en azote)	N graines / N total	$Kg.kg^{-1}$
EAgroA	Efficience agronomique de l'azote	(Rendement avec fertilisation- rendement sans fertilisation) / N_F	$Kg.kg^{-1}$
ANR	Apparent nitrogen recovery	((N total provenant de la fertilisation - N total provenant du sol) / N_F) x 100	%

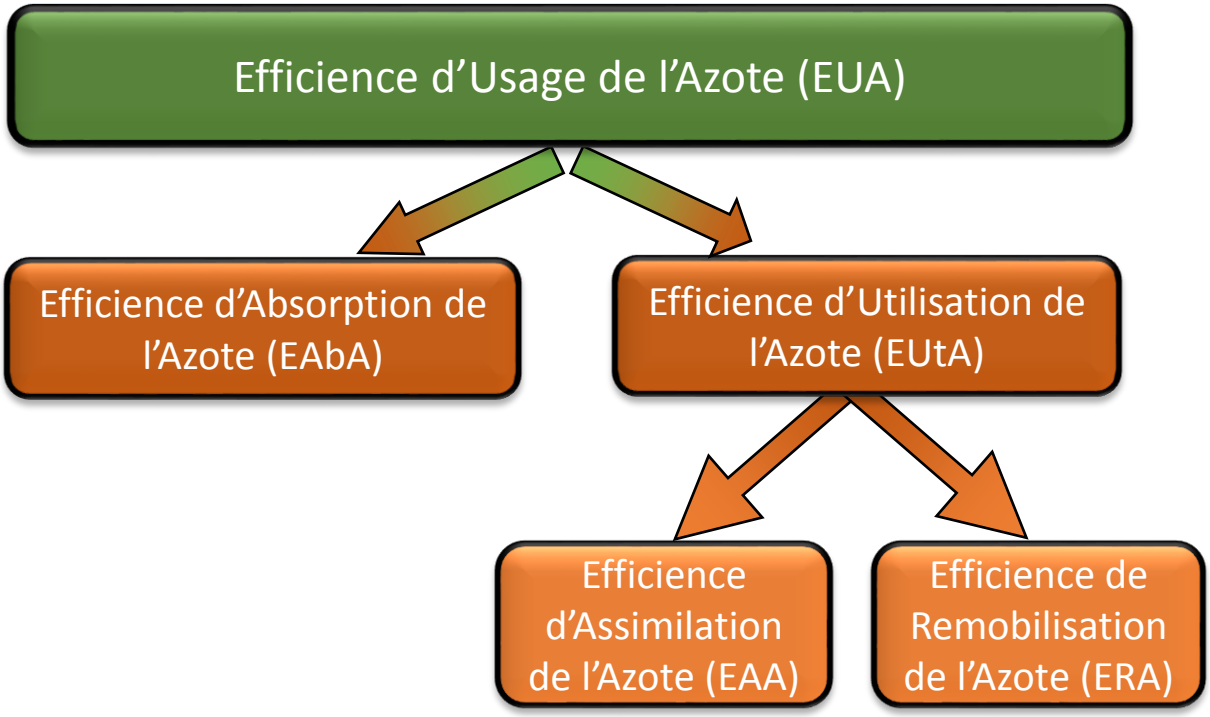


Fig. II.10. Les différentes composantes de l'Efficience d'Usage de l'Azote (EUA) (adapté de Masclaux-Daubresse *et al.,* 2010).

A.III.1. Définitions et composantes de L'EUA

L'évaluation des performances agronomiques des plantes de grande culture (évaluation du rendement et de la capacité à valoriser l'N) est une des préoccupations majeures en recherche agronomique et est à l'origine de la mise au point de nombreux indices (**Tableau II.1**) (Good *et al.*, 2004; Dawson *et al.*, 2008; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). L'un des indices les plus utilisés est l'Efficience d'Usage de l'Azote (EUA) qui permet d'estimer les performances de rendement au stade reproducteur en fonction du pool total d'N (*i.e.* N du sol et N provenant du fertilisant). Utilisé à d'autres stades de développement que le stade reproducteur, cet indice permet également d'évaluer la production de biomasse aérienne en fonction du pool d'azote total disponible pour la plante.

L'EUA est la résultante de deux composantes (**Fig. II.10**) que sont l'Efficience d'Absorption de l'Azote (EAbA) qui traduit les capacités de la plante à absorber l'N disponible et l'Efficience d'Utilisation de l'Azote (EUtA) qui permet d'estimer la capacité de la plante à produire de la biomasse en fonction de la quantité d'N absorbée. Cette EUtA est elle-même la résultante de deux composantes : l'Efficience d'Assimilation de l'Azote (EAA) traduisant les capacités de la plante à assimiler l'N absorbé et l'Efficience de Remobilisation de l'Azote (ERA) qui traduit la capacité de la plante à remobiliser l'N des tissus sénescents (tissus sources) vers les tissus en formations tels que les jeunes feuilles ou les graines (tissus puits) (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010).

A.III.1.a. La composante EAbA : L'efficience d'Absorption de l'Azote

L'Efficience d'Absorption de l'Azote (EAbA) traduisant les capacités de la plante à absorber l'azote du sol est à la fois régulée par des facteurs génétiques et environnementaux. A titre d'exemple, le colza absorbe l'N nitrique grâce à des systèmes de transports saturables à haute affinité (HATS) et des systèmes non saturables à faible affinité (LATS) pour le nitrate qui lui permettent de répondre à une large gamme de concentrations en cet élément dans le sol. Chacun de ces systèmes de transport se caractérise par une composante constitutive (cHATS et cLATS) active même lorsque la plante n'est pas alimentée en nitrate et une seconde composante (iHATS et iLATS) inductible par le nitrate (Crawford et Glass, 1998; Malagoli *et al.*, 2004; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010; Krapp *et al.*, 2014). Ces différents systèmes font appel à de nombreux transporteurs codés par des familles de gènes NRT (pour Nitrate Root Transporters). Chez le colza et *Arabidopsis thaliana*, il est généralement admis que deux familles de transporteurs NRT sont majoritairement impliquées dans l'absorption racinaire de nitrate : la famille NRT1 qui intervient majoritairement dans le système LATS et la famille NRT2 qui est impliquée essentiellement dans le système HATS (Tegeder et Masclaux-Daubresse, 2017).

Le colza présente des capacités d'absorption d'N (jusqu'à 250 kg N ha^{-1} au stade végétatif) largement supérieures à d'autres plantes de grandes cultures telles que les poacées et les légumineuses (Lainé *et al.*, 1993). Cette caractéristique lui a même valu d'être qualifiée de pompe à nitrate et d'être utilisé comme culture intermédiaire pour piéger le nitrate (CIPAN). Ainsi, en raison de ses capacités d'absorption déjà très élevées au stade végétatif, il est peu probable que l'EAbA soit un facteur limitant l'EUA et donc qu'il en constitue un levier d'amélioration potentielle. Une étude de 2006 a d'ailleurs montré que chez 4 génotypes de colza de printemps présentant des EUA contrastées, les variations observées étaient principalement dues à des variations de l'Efficiences d'utilisation de l'azote (EUtA) et non à des variations de l'EAbA(Svečnjak et Rengel, 2006).

Au stade reproducteur et plus précisément lors du remplissage des siliques, il a été observé une forte diminution des capacités d'absorption d'N chez le colza cultivé en condition contrôlée ou en condition de plein champ (Rossato *et al.*, 2001; Malagoli *et al.*, 2004; Noquet *et al.*, 2004). Le fait de voir une diminution de l'absorption en condition contrôlée suppose que cette baisse est essentiellement due à des facteurs internes et plus particulièrement à une diminution de l'expression des transporteurs de nitrate (Malagoli *et al.*, 2004). Cependant, l'absorption d'N post-floraison, bien que diminuée, reste néanmoins essentielle pour l'élaboration du rendement. En effet, de nombreuses études montrent l'existence d'une étroite relation entre l'absorption post-anthèse et la production de graines (Wiesler *et al.*, 2001; Berry *et al.*, 2010; Ulas *et al.*, 2013; Bouchet *et al.*, 2016). Ainsi, Wiesler et collaborateurs (2001) ont démontré que la faible quantité d'N absorbée au moment de la floraison permettait une amélioration du rendement grainier. Enfin, des études réalisées sur des colzas cultivés au champ sous contraintes azotées ont montré que l'EAbA était un facteur déterminant pour l'élaboration du rendement grainier (Berry *et al.*, 2010; Schulte auf'm Erley *et al.*, 2011; Nyikako *et al.*, 2014).

Par ailleurs, plusieurs études, réalisées chez différentes espèces végétales telles que le riz ou la tomate, montrent que la surexpression de transporteurs de nitrate s'accompagne d'une part, d'une augmentation d'absorption d'N et d'autre part, d'une augmentation de rendement en produits récoltés (Fan *et al.*, 2016*a*,*b*; Fu Yanlei *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2017). Chez le colza, la plupart des études montrent qu'une augmentation (ou un maintien) de l'absorption post-anthèse se traduit par une amélioration du rendement. L'ensemble de ces résultats montre donc que l'EAbA constitue un levier potentiel pour améliorer le rendement. Cependant, le plus souvent, ces optimisations d'EAbA nécessitent d'augmenter le pool d'azote disponible et donc d'augmenter les doses de fertilisants, ce qui va à l'encontre des préoccupations environnementales et économiques actuelles. Il est donc nécessaire de se tourner vers

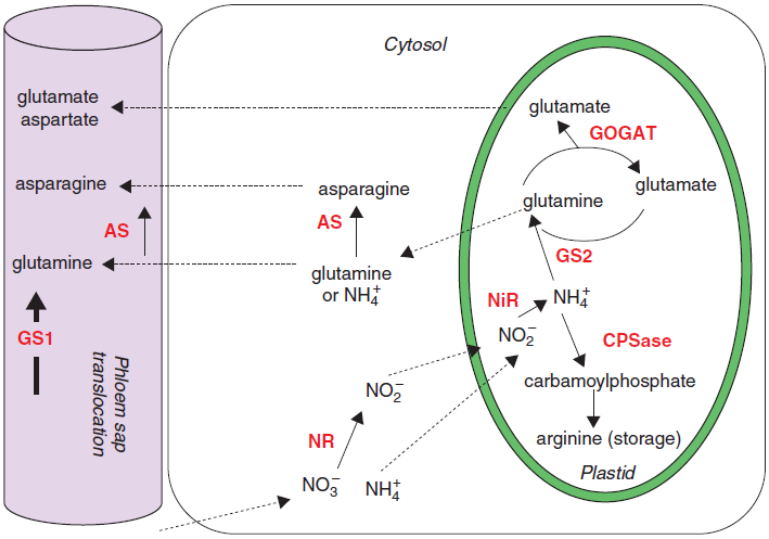


Fig. II.11. Schéma représentant les enzymes clés impliquées dans la gestion de l'azote lors de son assimilation dans une jeune feuille. Les enzymes sont indiquées en rouge. Asparagine : ASN ; Asparagine synthétase : AS ; Carbamoylphosphatase : CPSase ; Glutamate : GLU ; Glutamine : GLN ; Glutamine synthétase cytosolique : GS1 ; Glutamine synthétase chloroplastidiale : GS2 ; Glutamate synthase ou glutamine oxoglutarate synthétase : GOGAT ; Nitrite réductase : NiR ; Nitrate réductase : NR (d'après Masclaux-Daubresse *et al.,* 2010).

d'autres stratégies d'amélioration de l'EUA et notamment celles qui privilégient une optimisation de la gestion de l'N absorbé par les plantes.

A.III.1.b. L'efficience d'Utilisation de l'azote (EUtA), l'autre composante de l'EUA

La capacité des plantes à gérer l'N absorbé est définie comme l'efficience d'utilisation (EUtA). Cette deuxième composante de l'EUA est corrélée à différents indices de performances agronomiques tels que le Nitrogen Harvest Index (NHI) (He *et al.*, 2017) ce qui en fait une composante intéressante dans l'optique d'une optimisation de l'EUA (Ulas *et al.*, 2013; Bouchet *et al.*, 2016). L'EUtA étant la résultante de deux sous composantes, à savoir l'Efficience d'Assimilation de l'Azote (EAA) et l'Efficience de Remobilisation de l'Azote (ERA) (**Fig. II.10**), il est nécessaire de s'intéresser aux deux sous-composantes afin de mieux appréhender leur importance respective dans l'optimisation de l'EUA.

A.III.1.b.i. L'Efficience d'Assimilation de l'Azote (EAA)

L'Efficience d'assimilation de l'N (EAA) est la capacité de la plante à métaboliser l'N minéral absorbé dans le sol en azote organique (acides aminés notamment). Cette assimilation va faire appel à de nombreuses enzymes permettant par exemple de réduire les teneurs cellulaires en nitrate. Ainsi, une fois le nitrate absorbé par les transporteurs racinaires (NRT1 et 2, principalement), il sera réduit dans le cytosol en nitrite par une première enzyme, la Nitrate Réductase (NR) puis en ammonium par une seconde enzyme, la Nitrite Réductase (NiR). L'ammonium généré sera ensuite assimilé en acides aminés et plus particulièrement en glutamine ou glutamate *via* l'intervention de deux enzymes : la Glutamine Synthase (GS) - Glutamine 2-OxoGlutarate AminoTransférase (GOGAT). Dans un premier temps, la GS permet la fixation de l'ammonium sur le glutamate permettant la formation de glutamine qui, une fois prise en charge par la GOGAT, génère deux glutamates. Ces deux acides aminés (glutamine et glutamate) constituent des précurseurs de la biosynthèse de nombreux composés et notamment d'autres acide-aminés (grâce à l'action d'amino-transférases) essentiels à la biosynthèse de peptides et de protéines (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010; Krapp *et al.*, 2014) (**Fig. II.11**).

De nombreuses approches transgéniques ont mis en avant la possibilité d'améliorer l'EUA en optimisant l'EAA. Toutefois, la surexpression de nombreuses enzymes impliquées dans l'EAA telles que la NR et la NiR améliore l'assimilation et l'absorption du nitrate mais n'a aucun impact sur le rendement ou la croissance à cause de possibles régulations post-transcriptionnelles modulant l'activité de ces deux enzymes (Good *et al.*, 2004). Au contraire, d'autres enzymes impliquées dans l'assimilation de l'N telles que la GS, la GOGAT ou des amino-transférases comme l'alanine amino-transférase semblent être des

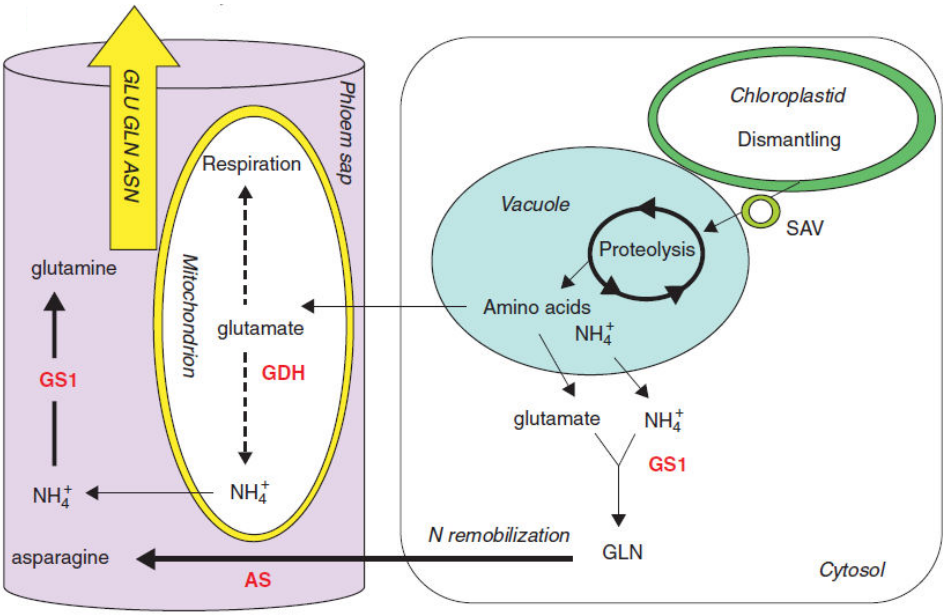


Fig. II.12. Schéma représentant les enzymes clés impliquées dans la remobilisation de l'azote d'une feuille sénescente. Les enzymes sont indiquées en rouge. Asparagine: ASN Asparagine synthétase : AS ; Glutamate : GLU ; Glutamine : GLN ; Glutamine synthétase cytosolique : GS1 ; Glutamate déshydrogenase : GDH ; Senescente associated vacuole : SAV (d'après Masclaux-Daubresse *et al.,* 2010).

candidats particulièrement intéressants pour l'optimisation de l'EUA (Thomsen *et al.*, 2014). En effet chez de nombreuses espèces, il a été montré que la surexpression de la GS et de la GOGAT se traduit par une augmentation de la biomasse et du rendement (Migge *et al.*, 2000; Fuentes *et al.*, 2001; Habash *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2018). Par ailleurs, chez le colza, la surexpression d'un gène codant une alanine amino-transférase d'orge ou de la luzerne a permis d'améliorer l'EUA se traduisant par une augmentation de biomasse d'environ 30% (Good *et al.*, 2007; McAllister *et al.*, 2016).

En France, la culture de semences transgéniques étant interdite, ces approches permettront surtout de donner des cibles intéressantes pour la sélection variétale afin d'obtenir des colzas avec une meilleure EAA et donc une EUA potentiellement optimisée.

A.III.1.b.ii. L'Efficience de Remobilisation de l'Azote (ERA)

L'efficience de remobilisation de l'azote (ERA) traduit la capacité de la plante à remobiliser l'N endogène des tissus sources (organes sénescents) vers les tissus puits (organes en croissance). L'efficience de remobilisation sera donc essentiellement liée au processus de senescence et pourra, chez le colza, être mesurée à deux stades : une ERA au stade végétatif, où il y a une remobilisation des éléments des feuilles sénescentes vers les jeunes feuilles grâce à la sénescence séquentielle et une ERA au stade reproducteur où il y a une remobilisation de tous les organes de la plante (feuilles, tiges, racines, péricarpes…) au profit des graines *via* la sénescence monocarpique (**Fig. II.2**). Cette remobilisation va nécessiter une dégradation d'N organique endogène (protéines) *via* l'intervention de divers systèmes protéolytiques et de processus complexes comme l'autophagie, par exemple (**Fig. II.12**). Une fois les protéines dégradées, les acides-aminés générés peuvent être utilisés localement pour alimenter la production d'énergie (*via* la respiration mitochondriale) ou transformés en glutamine ou asparagine par la Glutamine Synthétase cytosolique (GS1) et Asparagine Synthétase (AS) afin d'être exportés jusqu'aux tissus puits *via* le phloème.

Au stade végétatif, le colza présente une faible ERA qui se caractérise notamment par des teneurs en N résiduel dans les feuilles chutées élevées de l'ordre de 2 à 4,5 % de la matière sèche (Triboi-Blondel *et al.*, 1988; Dejoux *et al.*, 2000). En plus des conséquences environnementales non négligeables, cette mauvaise ERA a également un impact négatif sur la production grainière du colza (Malagoli *et al.*, 2005*b*). Dans ce contexte, l'ERA constitue un levier d'optimisation de l'EUA du colza particulièrement intéressante et ce, d'autant qu'il semble exister une variabilité génotypique naturelle de cette composante. En effet, une étude récente réalisée par Girondé et collaborateurs (2015b) a mis en évidence des différences d'ERA chez 10 génotypes de colza et montré que les génotypes les plus efficients étaient aussi ceux qui présentaient la meilleure capacité de dégradation des protéines solubles. D'autres travaux focalisés sur

deux génotypes de colza (Capitole et Ténor) à ERA contrastées en conditions limitantes en N, ont établi un lien entre forte ERA et forte activité des protéases à cystéine et à sérine notamment au niveau foliaire (Poret, 2016).

Durant le stade reproducteur, l'N nécessaire au remplissage des graines est majoritairement issu de la dégradation des protéines de tous les organes de la plantes (tiges, feuilles, péricarpes et racines). Durant cette période du cycle, l'ERA du colza est très supérieure à celle observée au stade végétatif puisque l'azote résiduel des feuilles chutées représente seulement 1% de la masse sèche (Malagoli *et al.*, 2005*a*). L'ERA au stade reproducteur est également soumise à la variabilité génotypique puisque des travaux réalisés à partir de différents génotypes de colza d'hiver et de printemps montrent que les génotypes présentant la meilleure efficience de remobilisation d'N des tissus foliaires et caulinaires se caractérisent par de fortes teneurs en N dans les graines (Balint et Rengel, 2011; Girondé *et al.*, 2015*a*). Cependant, même si les teneurs en N résiduel des tiges sont généralement plus élevées que celles des feuilles chutées, des études montrent qu'une optimisation de la remobilisation de l'N de la tige n'aurait que peu d'impact sur le rendement grainier (Ulas *et al.*, 2013). Ces études sont en accord avec de précédents travaux montrant que les feuilles sont les organes sources majoritaires au moment du remplissage des graines (Rossato *et al.*, 2001; Gombert *et al.*, 2010). Enfin, bien que peu étudiés, les péricarpes sont également des tissus importants puisqu'ils participent également au remplissage en N des graines (Balint et Rengel, 2011). Ainsi, lors d'une étude récente conduite sur le colza, Poret (2016) a suggéré qu'une optimisation du recyclage de l'N des péricarpes pourrait influer positivement sur l'ERA.

A ce jour, il semble admis que la faible EUA du colza est donc principalement liée à une faible ERA, que ce soit en conditions contrôlées ou en conditions de plein champ (Malagoli *et al.*, 2005*a*,*b*; Tilsner *et al.*, 2005; Gombert *et al.*, 2006; Girondé *et al.*, 2015*a*,*b*). De toutes les composantes de l'EUA, l'ERA semble être le levier le plus pertinent pour optimiser l'EUA. Par ailleurs, une meilleure remobilisation/exportation des stocks endogènes d'N de la plante devrait conduire d'une part, à une réduction des doses d'intrants N et d'autre part, à un maintien, voire une amélioration, du rendement grainier du colza. Par conséquent, l'optimisation de l'ERA constitue une priorité dans l'objectif d'optimisation de l'EUA et devrait permettre de répondre aux enjeux environnementaux et économiques actuellement assujettis à la culture du colza. Pour répondre à ce défi, il est nécessaire de connaître et d'identifier précisément les déterminants moléculaires impliqués dans les processus de remobilisation de l'N associée à la sénescence. Ceci dit, des travaux sur les transporteurs d'acides aminés chez le colza dans les feuilles sénescentes ayant montré que le chargement du phloème n'était pas limitant dans la remobilisation de l'azote (Tilsner *et al.*, 2005), il

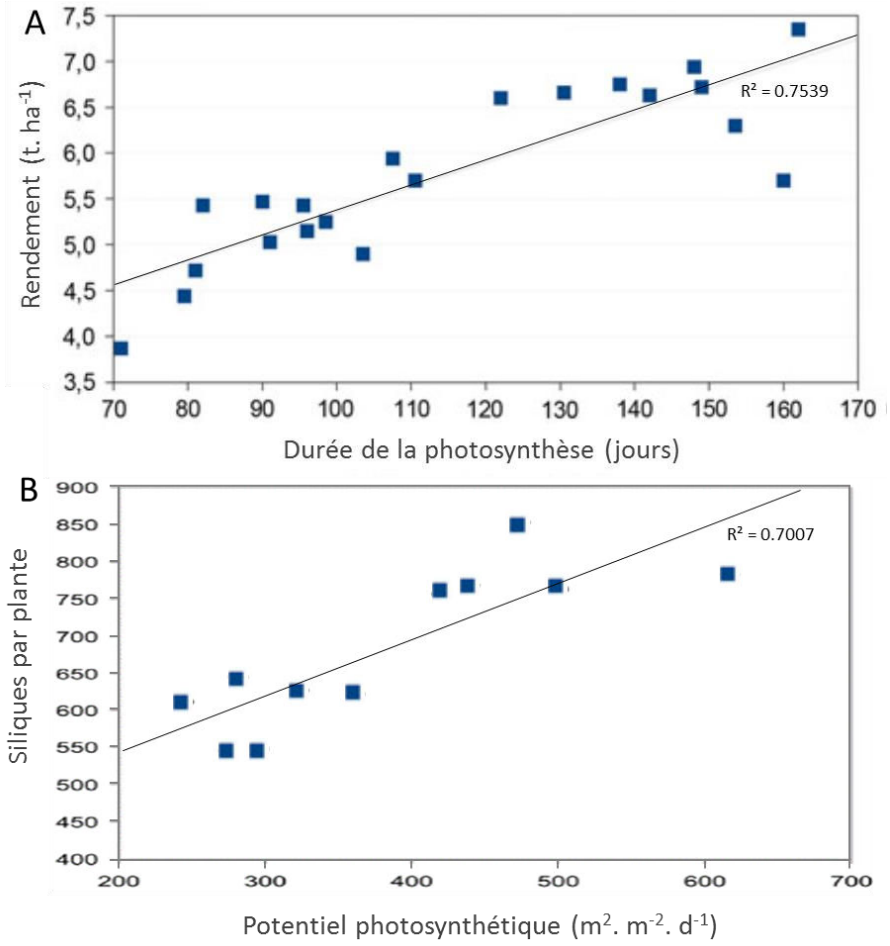


Fig. II.13. Corrélations entre le potentiel photosynthétique, le rendement en graines chez le maïs (A) et le nombre de siliques par plante chez le colza (B). Les corrélations sont réalisées à partir d'un échantillon de 10 génotypes de maïs (A ; Thomas and Smart, 1993) et 11 génotypes de colza (B ; Hunkova *et al*., 2011) (adapté de Gregersen *et al*., 2013 et Hunkova *et al*., 2011).

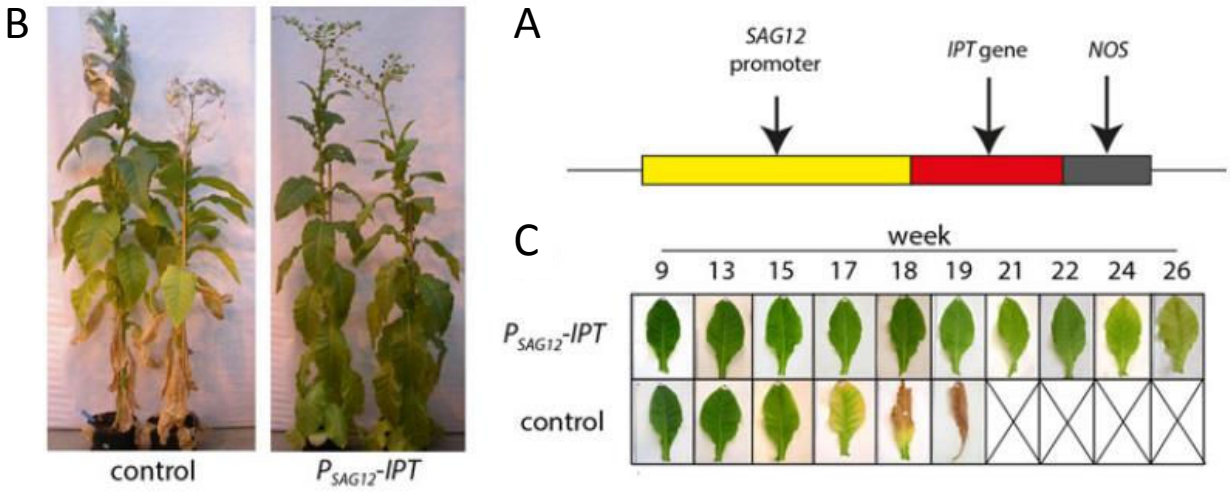


Fig. II.14. Retard de la sénescence foliaire obtenu chez le tabac par autorégulation de de la production de cytokinines. Le promoteur *SAG12* a été fusionné avec un gène codant une enzyme impliqué dans la synthèse des cytokinines, l'isopentenyl transférase (P_{SAG12}-*IPT* ; A). Illustration du retard de la progression spatial (A) et temporelle (B) de la sénescence foliaire (d'après Gregersen *et al*., 2013).

semble particulièrement opportun de s'intéresser prioritairement aux acteurs (protéases et inhibiteurs de protéases, notamment) impliqué dans les différentes voies de dégradation des protéines.

B. De la sénescence à la remobilisation de l'azote

La sénescence est, dans l'histoire d'une plante, d'un organe ou d'une cellule, l'étape finale de développement qui mènera à sa mort. Lors de ce processus très organisé et hautement régulé, une modification complète du métabolisme au sein de l'organe se réalise. Ce processus est caractérisé par la remobilisation des différents éléments tels que les éléments carbonés, azotés, soufrés, vers les organes en croissances lors de **la sénescence séquentielle** ou vers les graines lors de **la sénescence monocarpique** (Gregersen *et al.*, 2013; Avice et Etienne, 2014). La sénescence et la remobilisation de l'azote qui lui sont associées permettent d'une part de conserver les ressources au profit des organes en croissance, on parlera alors de recyclage, et d'autre part, de remobiliser l'azote des différents organes pour la production des graines (Gregersen, 2011). Cet azote qui est déjà absorbé et assimilé est un élément déjà à disposition de la plante et donc facilement remobilisable.

L'efficacité de la sénescence, et donc de la remobilisation, aura un impact majeur sur le rendement. Cela fait plusieurs décennies que la relation entre le rendement et la sénescence a été observée (Thomas et Stoddart, 1980). En effet, un retard de la sénescence améliore le rendement chez de nombreuses espèces dont le colza (**Fig. II.13**) (Thomas et Smart, 1993; Hunková *et al.*, 2011; Gregersen *et al.*, 2013). Un exemple permettant de mettre en avant le lien étroit entre la sénescence et le rendement sont les lignées dites « stay-green » (Kusaba *et al.*, 2013). Certaines lignées « stay-green » sont caractérisées par un retard de sénescence ou une progression de la sénescence plus lente associé à une augmentation de la biomasse et du rendement. Une autre approche faisant appel à des manipulations génétiques ont permis d'associer un meilleur rendement avec un retard de la sénescence. Cette approche est l'expression de gène IPT (isopenteny ltransferase gene) codant pour une enzyme qui catalyse une étape limitante de la biosynthèse de cytokinines. Les cytokinines sont des hormones connues pour retarder les processus de sénescence. De nombreuses expérimentations où le gène IPT a été couplé à un promoteur de sénescence, tel que le promoteur **SAG12** (pSag12), connu pour être un promoteur spécifique de la sénescence, ont montré un retard de sénescence avec une augmentation de biomasse associée à une période d'activité photosynthétique plus longue (**Fig. II.14**) (Gan et Amasino, 1995, 1997). Tout cela montre qu'il pourrait être opportun de prolonger l'activité photosynthétique des feuilles en ralentissant leur sénescence afin de réduire l'asynchronisme entre la période de vidage de ces organes sources et la

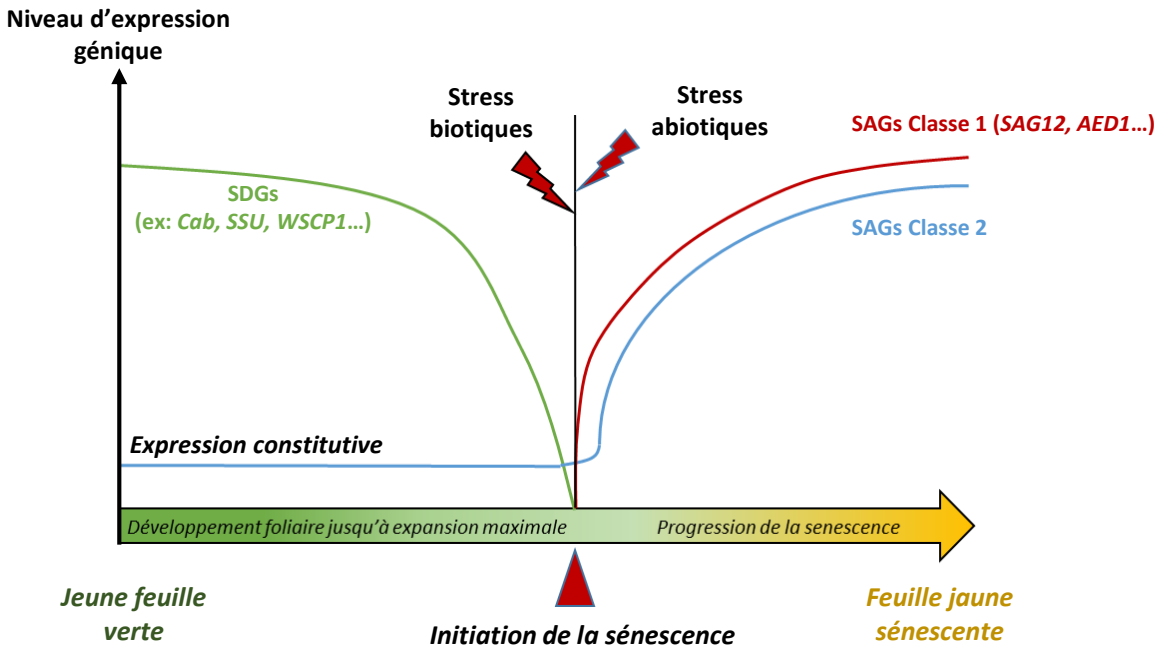


Fig. II.15. Profil d'expression de gènes Senescence Down-regulated Genes (*SDGs*) et Senescence Associated Genes (*SAGs*) au cours du développement d'une feuille. Les gènes SDGs comprennent des gènes codant des protéines impliquées dans la photosynthèse telles que la protéine liant la chlorophylle a/b (Cab) et la petite sous-unité de la RuBisCO (SSU). Les *SAGs* de Classe I sont exprimés uniquement pendant la sénescence alors que les *SAGs* de Classe II ont un niveau d'expression constitutif et sont fortement induits lors de la sénescence (adapté de Gan and Amasino, 1997 et Zimmerman and Zentgraf, 2005).

période de remplissage des grains (Malagoli *et al.*, 2005*b*). Toutefois, de telles stratégies nécessitent de mieux comprendre les mécanismes et les acteurs intervenant durant la sénescence foliaire.

B.I. La sénescence foliaire

La sénescence foliaire, stade de développement ultime de cet organe, correspond à un processus génétiquement programmé entrainant une sous-expression de certains gènes appelés *SDGs* (Senescence Down-regulated Genes) accompagné d'une sur-expression d'autres gènes nommés *SAGs* (Senescence Associated Genes) (**Fig. II.15**; Gan et Amasino, 1997; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Zimmermann et Zentgraf, 2005). Au niveau de la feuille, cette modulation de l'expression génique est accompagnée d'une dégradation massive des macromolécules (lipides, glucides, protéines et acides nucléiques). Au niveau visuel, la sénescence se caractérise par un jaunissement des feuilles consécutif à la dégradation de l'appareil photosynthétique et notamment des chlorophylles. Cette étape de dégradation est suivie d'un desséchement puis de l'excision de la feuille. Avant l'étape finale caractérisée par la mort de l'organe, une grande partie des éléments issus de la dégradation des composées cellulaires seront remobilisés vers les organes en croissance. Ce n'est seulement que lorsque cette étape de remobilisation est terminée que la feuille chutera. La sénescence est un processus réversible (sauf lorsqu'elle est en phase terminale, voir ci-après) puisque certaines études ont montré, qu'en réponse à différents traitements (apport de silicium, notamment), des feuilles sénescentes ayant remobilisé l'essentiel de leurs composés endogènes ont reverdi et récupéré leur capacité à photosynthétiser (Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999; Haddad *et al.*, 2018).

B.I.1. Les processus associés à la sénescence foliaire

Une description du processus de sénescence en 3 phases proposée par Zimmermann et Zentgraf, (2005) permet d'avoir une vision intégrée du déroulement de ce processus. Ces 3 phases sont:

- la phase d'initiation de la sénescence (phase 1)
- la phase de recyclage des composées cellulaires (phase 2)
- la phase terminale (phase 3)

B.I.1.a. Phase n°1 : Initiation de la sénescence

Lors de l'initiation de la sénescence, certains gènes (SDGs) tels que ceux codant des protéines associées à la photosynthèse sont réprimés alors que d'autres (*SAGs*) codant des enzymes, nécessaires au catabolisme ou au transport des nutriments sont surexprimés, (**Fig. II.15** ; Lohman *et al.*, 1994; Gan et Amasino, 1997; Guo *et al.*, 2004; Gombert *et al.*, 2006; Guiboileau *et al.*, 2010). Les gènes *SAGs* sont

représentés par 2 classes : la classe I correspondant aux gènes exprimés seulement lors de la sénescence telles que ***SAG12***, *SAG13* et *LSC54*, et la classe II correspondant aux gènes caractérisés par une expression constitutive qui est fortement augmentée lors de la sénescence (Gan et Amasino, 1997). D'une manière générale, la sénescence peut être induite par des facteurs endogènes et/ou exogènes. Les facteurs exogènes entrainant la sénescence sont multiples : la sècheresse, la lumière, la carence nutritionnelle (et notamment la carence azotée), les attaques par des agents pathogènes… Les facteurs endogènes quant à eux sont essentiellement liés à l'âge de la feuille ou à la mise en place des organes reproducteurs (Zimmermann et Zentgraf, 2005; Diaz-Mendoza *et al.*, 2016). Tous ces facteurs, qu'ils soient endogènes ou exogènes, aboutissent à une modulation de l'expression des gènes spécifiques de la sénescence (*SAGs* et/ou *SDGs*). A titre d'exemple, les phytohormones, facteurs endogènes qui seront présentés ci-après, sont capables d'induire l'expression des différents facteurs de transcription tels que WRKY53 ou AtNAP (famille des NAC) connus pour intervenir dans l'augmentation de l'expression de gènes *SAGs* et notamment celle du gène ***SAG12*** (Miao *et al.*, 2004; Guo et Gan, 2006).

B.I.1.a.i. Les facteurs endogènes

Les facteurs endogènes induisant la sénescence sont associés au développement de la plante. Il en existe deux majoritaires chez le colza : l'âge de l'organe et la transition stade végétatif-stade reproducteur de la plante (Zimmermann et Zentgraf, 2005; Lim *et al.*, 2007).

Concernant le premier facteur (âge de l'organe), lorsqu'une feuille atteint sa maturité, *i.e.* qu'elle a atteint son niveau maximal d'expansion. Sa phase de développement suivante est l'entrée en sénescence qui la fait basculer du statut d'organe puit à celui d'organe source. Ce facteur endogène lié à l'âge de l'organe est à l'origine de la sénescence foliaire séquentielle observée chez le colza durant son développement végétatif. Si la raison de ce changement de statut n'est pas clairement définie, de nombreux travaux suggèrent néanmoins que le contenu en sucre de l'organe pourrait en être une des causes (Masclaux *et al.*, 2000; Quirino *et al.*, 2000). Ainsi, une forte teneurs en sucres dans la feuille se traduirait par une régulation négative de l'activité photosynthétique à l'origine de l'initiation de la sénescence (Dai *et al.*, 1999). De plus, une simulation de ce phénomène par un apport exogène de glucose sur une feuille aboutit à une entrée en sénescence d'autant plus rapide que la plante a été cultivée en condition de faible alimentation azotée (Wingler *et al.*, 2006).

Lorsqu'une plante atteint le stade reproducteur, tous ses organes, indépendamment de leur âge de développement (feuilles, racines, tiges, péricarpes…), vont entrer en sénescence afin de permettre la maturation des graines en remobilisant tous les éléments essentiels à leur remplissage.

Tableau II-2. Composantes de rendement, teneur en huile, en protéines et en glucosinolates dans des graines matures produites par des plantes cultivées sous différentes conditions de nutrition soufrée. Les valeurs correspondent à la moyenne ± S.E. (n = 6 pour le contrôle; n = 4 pour LS70, LS53 et LS32). Les différences significatives par rapport à la valeur du contrôle (508,7 µM SO_4^{2-}) sont indiquées un astérisque ($p < 0,05$). Les traitements LS70, LS53 et LS32 correspondent respectivement à une forte limitation en soufre (8,7 µM SO_4^{2-}) appliquée lors de la chute des premiers pétales (GS70), de l'apparition de l'inflorescence principale (GS53) et au début de la montaison (GS32) (adapté de d'Hooghe *et al.*, 2014).

	Masse sèche totale des graines par plante (g)	Longueur maximale des siliques (cm)	Nombre de siliques par plante	Poids de mille graines (g)	Teneur en huile dans les graines matures (% MS)	Teneur en proteines dans les graines matures (% MS)	Teneur en glucosinolates dans les graines matures (µmol g^{-1} MS)
Control	11,6 ± 0,61	8,3 ± 0,1	178 ± 4	4,6 ± 0,04	45 ± 0,5	23 ± 0,3	14 ± 0,4
LS70	11,7 ± 0,49	7,9 ± 0,1 *	187 ± 7	4,6 ± 0,05	45 ± 0,2	23 ± 0,2	8.3 ± 0,5 *
LS53	11,6 ± 0,81	8,4 ± 0,1	165 ± 9	4,9 ± 0,1	43 ± 0,3 *	22 ± 0,2	2,5 ± 0,4 *
LS32	6,30 ± 0,66 *	7,5 ± 0,8	162 ± 6	3,1 ± 0,39 *	32 ± 1,3 *	21 ± 0,3 *	4,2 ± 0,9

B.I.1.a.ii. Les facteurs exogènes

Le colza est soumis à de nombreux stress biotiques ou abiotiques l'empêchant d'avoir une croissance optimale. Ces différents stress sont des facteurs exogènes qui aboutissent généralement à une entrée en sénescence des organes touchés.

Les stress biotiques associées aux infections par des agents pathogènes (Phoma, sclérotinia, oïdium) et à l'attaque de ravageurs (charançons, méligèthes, altises, pucerons…) impactent fortement la sénescence et le rendement (Pageau *et al.*, 2006; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010; Diaz-Mendoza *et al.*, 2016). Quel que soit le stress biotique, il est généralement constaté une induction de la sénescence qui permet d'une part, de priver l'agent pathogène et/ou le ravageur d'élément nutritif, et d'autre part, de recycler les différents éléments vers des tissus sains en cours de développement. Lors de la réponse des plantes aux stress biotiques et notamment lors de la mise en place de la réaction hypersensible, il a été constaté une induction de protéases dont certaines, telles que **SAG12**, sont connues pour être induite au cours de la sénescence (Kempema *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2013).

Les stress abiotiques sont nombreux et ont des effets plus ou moins importants sur la sénescence :

Le stress nutritif est l'un des principaux stress abiotiques auxquels sont confrontées les plantes. Chez le colza, au moins deux éléments peuvent fréquemment provoquer une carence au champ en ayant des conséquences sur le rendement : le soufre et l'azote. Tout d'abord, le colza est très sensible au **stress soufré.** Chez le colza, outre le fait qu'une limitation en soufre impacte directement le rendement et la qualité des graines (**Tableau II-2** ; Girondé *et al.*, 2014; D'Hooghe *et al.*, 2014)**,** d'autres études ont montré que cette carence a également des effets sur la sénescence foliaire. En effet, Dubousset *et al.*, (2009) ont montré qu'une carence modérée en soufre se traduit notamment par un ralentissement de la sénescence des feuilles âgées. Cet effet surprenant s'explique notamment par le fait que le soufre est majoritairement stocké sous forme de sulfate dans les vacuoles dont la mobilisation ne nécessite pas d'activité catabolique mais l'intervention de transporteurs spécifiques (famille des transporteurs SULTR4 ; Abdallah *et al.*, 2010). Ainsi, un retard de sénescence conduit à un allongement de durée de vie de la feuille et par voie de conséquence, à une augmentation de la durée de vidage en soufre de cet organe. Ainsi, ce n'est que lorsque l'ensemble des réserves vacuolaires en sulfate seront totalement épuisées (en cas de carence modérée de longue durée ou d'une carence sévère en S) que la carence en soufre va provoquer une induction de la sénescence afin d'induire les activités cataboliques nécessaires à la mobilisation du soufre contenu dans les macromolécules telles que les protéines (Dubousset *et al.*, 2009).

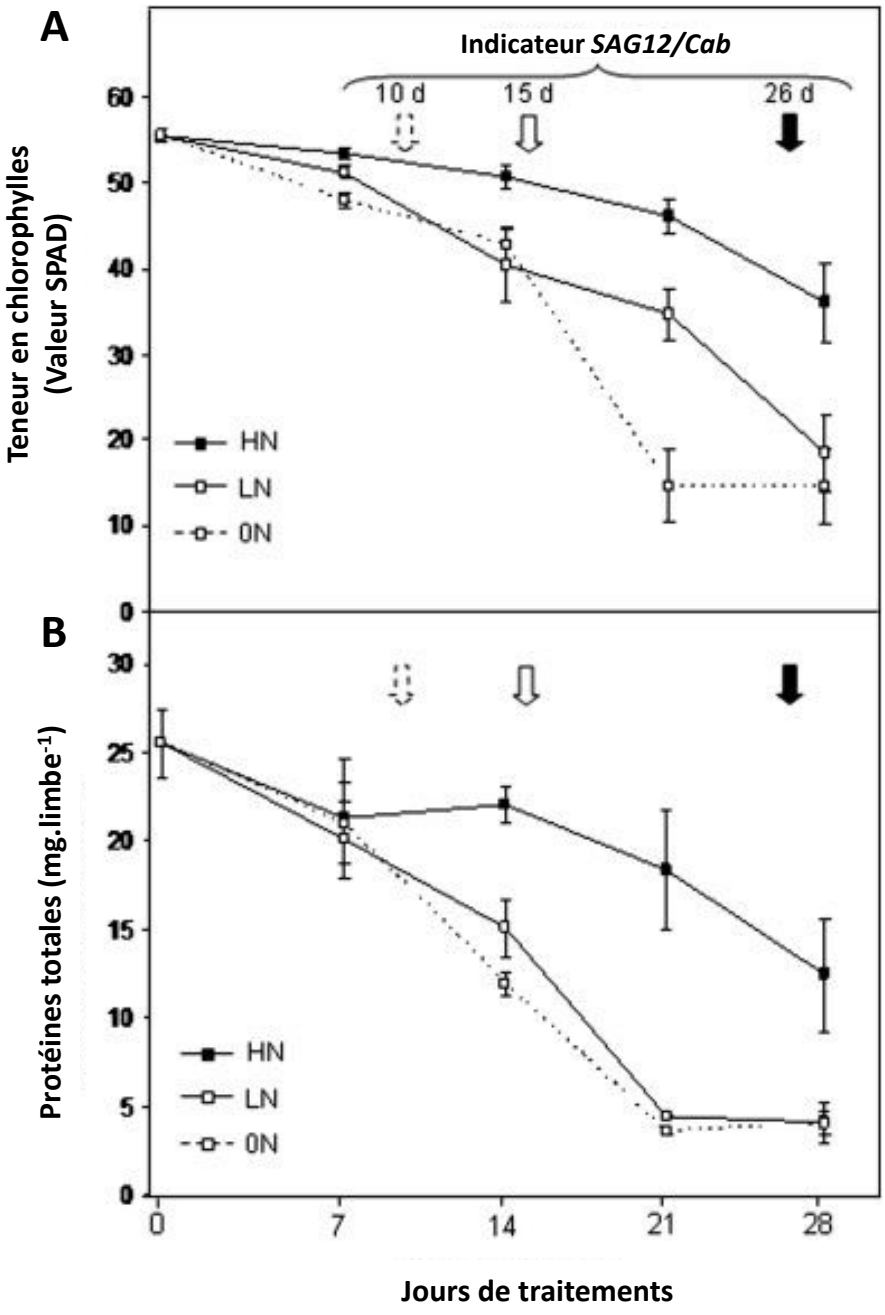


Fig. II.16. Evolution de la teneur en chlorophylles (A) et de la quantité de protéines totales (B) dans une feuille mature de colza. Les flèches correspondent à la date théorique d'entrée en sénescence estimée par l'indicateur *SAG12/Cab* pour chaque condition *:* HN : High Nitrogen (4 mM de KNO_3), LN : Low Nitrogen (0,5 mM de KNO_3) et 0N : sans azote (adapté de Desclos *et al*., 2009).

Le stress azoté est très répandu chez le colza cultivé en condition de plein champ et affecte négativement sa biomasse et son rendement (Rathke *et al.*, 2006; Bouchet *et al.*, 2016). Une étude en condition contrôlée de Girondé *et al.*, (2015*a*) sur deux génotypes de colza caractérisés par une NRE et NUE contrastées en condition de limitation en N, montre un rendement impacté de plus de 40 % lors d'un stress azoté. Les graines provenant de plantes cultivées avec une carence en azote ont une variation du ratio C:N caractérisée par une diminution des teneurs en protéines de réserves au dépend d'une augmentation en acide gras. Au niveau foliaire, contrairement à la limitation en S, la carence en N entraine une accélération de l'entrée en sénescence se traduisant par une diminution rapide des teneurs en chlorophylles et en protéines (**Fig. II.16** ; Desclos *et al.*, 2009; Gombert *et al.*, 2010; Girondé *et al.*, 2015*a*). Cette réponse favorise la mobilisation des réserves organiques d'N des feuilles sénescentes afin de répondre aux besoins en N des jeunes organes en croissance. Afin de remobiliser au mieux les réserves, une carence en N entraine une augmentation de la protéolyse marquée par une induction des différentes classes de protéases dans les feuilles matures (Girondé *et al.*, 2016; Poret *et al.*, 2016). Contrairement à cette accélération de la senescence des feuilles mature, une induction des WSCPs (décrites plus en détail dans la partie B.II.3.a) permettant un retard d'entrée en senescence des jeunes feuilles grâce à un maintien du métabolisme (intégrité protéique et photosynthèse) est observé en condition de stress azoté (Desclos *et al.*, 2008).

Le colza terminant son développement durant l'été, il peut facilement être touché par **un stress hydrique**. Outre des effets négatifs sur la croissance et le rendement, un stress hydrique va induire plus spécifiquement la sénescence et se traduire notamment par une dégradation précoce des chlorophylles. Cette sénescence accélérée provoque la chute prématurée des feuilles âgées afin de diminuer les pertes importantes en eau par la transpiration et maintenir ainsi l'équilibre hydrique de la plante (Zhang et Zhou, 2013; Basu *et al.*, 2016).

La lumière est un élément essentiel pour le développement de la plante. A titre d'exemple, un manque de lumière se traduit notamment par une chute des teneurs en chlorophylles et de l'activité photosynthétique conduisant à une accélération de la sénescence foliaire (Zhang et Zhou, 2013). Par ailleurs, des études utilisant l'obscurité pour induire la sénescence foliaire montrent que de nombreuses gènes SAGs codant des protéases telles que les protéases à cystéine comme **SAG12** sont induits par ce facteur environnemental dans les feuilles privées de lumière (Pružinská *et al.*, 2017).

Le stress oxydatif, et notamment celui induit par l'ozone, induit également l'expression de gènes SAGs et se traduit par une sénescence foliaire accélérée (Guo et Gan, 2005). Ainsi, chez le colza, un niveau

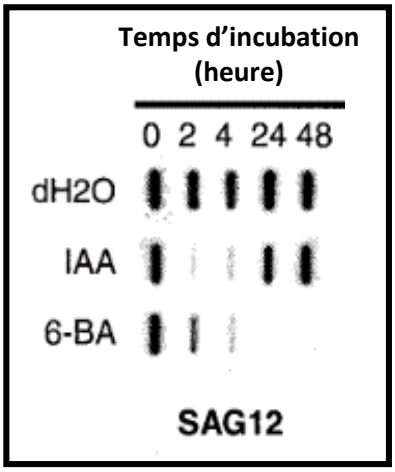


Fig. II.17. Expression du gène *SAG12* dans une feuille d'*Arabidopsis*. Les spots présentés sont obtenus après différents temps d'incubation de la feuille dans une solution contenant ou non (dH_20) différentes hormones : IAA : acide Indole 3-acétique (auxine) ; 6-BA : Cytokinine (adapté de Noh et Amasino, 1999).

élevé de pollution à l'ozone provoque une diminution des teneurs foliaires en sucres, en chlorophylles et en lipides et plus particulièrement en acides gras insaturés (Köllner et Krause, 2003; Namazkar *et al.*, 2016).

Ces différents facteurs régulant la sénescence font intervenir de nombreuses voies de signalisations impliquant le plus souvent des phytohormones.

B.I.1.a.iii. Les phytohormones

Les phytohormones, de par leur effet pléiotrope, peuvent agir sur une multitude de processus et de voies métaboliques. De ce fait, leur action est complexe, souvent difficile à caractériser et il est parfois difficile d'avoir une vision intégrée de leurs rôles respectifs. Toutefois, dans la littérature, l'intervention des phytohormones au cours de la sénescence est assez bien établie. Ainsi, il est possible de classer les différentes phytohormones intervenant durant la sénescence, en deux grandes catégories : les phytohormones qui régulent négativement la sénescence et celles qui la régulent positivement.

- Les phytohormones qui régulent négativement la sénescence : l'auxine et les cytokinines

Les cytokinines et **l'auxine** sont des de phytohormones qui interviennent dans divers processus liés au développement (différenciation des organes, structuration vasculaire…) et notamment durant la sénescence. Le rôle répresseur des cytokinines sur la sénescence est relativement bien caractérisé et il est généralement admis que l'entrée en sénescence coïncide avec une diminution des teneurs en cytokinines (Lim *et al.*, 2007). D'ailleurs, comme précédemment présenté, des lignées d'*Arabidopsis thaliana* exprimant le gène codant pour l'isopentenyl transferase (IPT), enzyme intervenant dans la synthèse des cytokinines, sous le contrôle du promoteur **SAG12** (*pSAG12*) présentent un retard de sénescence foliaire (**Fig. II.14** ; Gan et Amasino, 1997). Le rôle de l'auxine lors de la sénescence est en revanche beaucoup plus ambigu. En effet, même si, comme pour les cytokinines, des travaux réalisés sur plusieurs espèces végétales montrent qu'une application exogène d'auxine réprime de nombreux gènes *SAGs* (dont ***SAG12***) et s'accompagne d'un retard de sénescence (**Fig. II.17** ; Richmond et Lang, 1957; Noh et Amasino, 1999*b*; Lim *et al.*, 2007; Xu et Huang, 2009; Hwang *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2014), d'autres auteurs observent, au contraire, une augmentation des teneurs en auxine durant la sénescence (Lim *et al.*, 2007).

- Les phytohormones qui induisent la sénescence : **l'éthylène (Eth)**, l**e Méthyl jasmonate (MeJa), l'acide salicylique (SA), l'acide absicique (ABA) et les gibbérelines (GA).**

Ces phytohormones sont généralement connues pour être impliquées dans la réponse aux stress mais plusieurs éléments permettent également de leur attribuer un rôle dans l'induction de la sénescence. En effet, pour la plupart de ces phytohormones (**Eth**, **MeJa**, **ABA, SA)**, une accumulation est observée dans

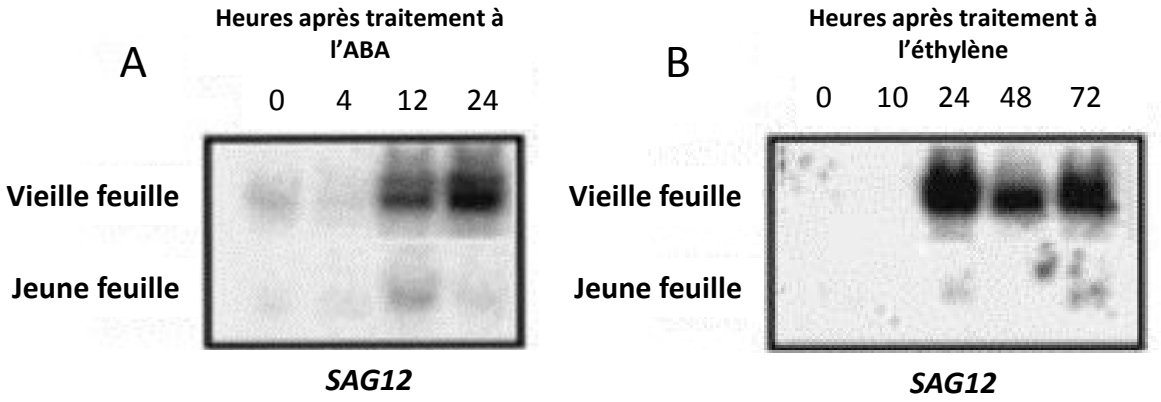


Fig. II.18. Expression du gène *SAG12* dans une feuille jeune ou vielle après traitement à l'acide abscissique (ABA ; A) ou à l'éthylène (B) (adapté de Weaver *et al*., 1998).

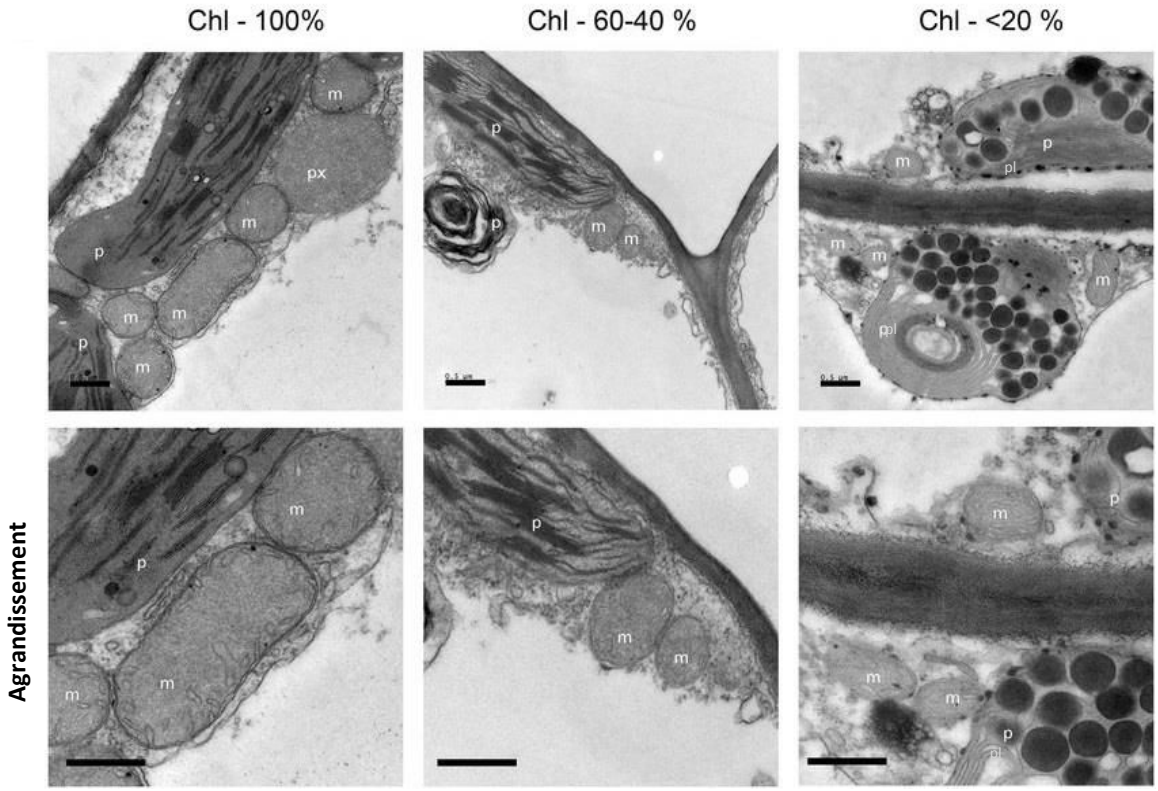


Fig. II.19. Ultrastructure des mitochondries et des chloroplastes en fonction du stade d'avancement de la sénescence foliaire.
Les feuilles présentant 100%, 60-40% et moins de 20% de chlorophylles correspondent respectivement à des feuilles non, moyennement et très sénescentes. M: mitochondrie; p: plaste; pl: plastoglobule; px: peroxysome. Trait d'échelle = 0,5 µm (d'après Chrobok *et al.*, 2016).

les feuilles sénescentes avec par exemple une accumulation par 4 (comparée à une feuille non sénescente) de la quantité de **SA** (Weaver *et al.*, 1998; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2007; Seltmann *et al.*, 2010). Par ailleurs, plusieurs études montrent que des applications exogènes de ces phytohormones (**Eth, MeJa, ABA, GA)** par pulvérisation foliaire se traduisent par une augmentation de l'expression de certains gènes *SAGs* (**Fig. II.18** ; **SAG12,** notamment) et s'accompagnent d'une induction de la sénescence foliaire (Weaver *et al.*, 1998; Jing *et al.*, 2005; Desclos *et al.*, 2008; Reinbothe *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2018). Enfin, l'utilisation de plantes mutantes caractérisées soit par une altération de la voie de biosynthèse de certaines de ces phytohormones (e.g. **GA** et **SA** (Morris *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014, 2017; Zhang *et al.*, 2018)) ou soit par une insensibilité à l'**Eth** (Oh *et al.*, 2003; Jing *et al.*, 2005) présentent une sénescence retardée. L'ensemble de ces travaux suggèrent fortement que ces phytohormones agissent comme des régulateurs positifs de la sénescence.

Toutefois, l'action de ces phytohormones n'est pas si simple à comprendre puisque certaines études suggèrent fortement que ces molécules vont le plus souvent agir en synergie. Ainsi, *in planta*, les variations conjointes des teneurs (autrement dit, la balance hormonale) sont certainement à l'origine des effets inducteurs ou répresseurs sur la sénescence. Par exemple, il a été démontré qu'un fort ratio ([acide salicylique] + [acide absicique]) / [cytokinines] favorise la sénescence *via* une induction de l'activité protéasique responsable d'une meilleure ERA (Poret, 2016).

B.I.1.b. Phase n°2 : Recyclage des composés cellulaires

La phase n°2 est caractérisée par un recyclage des composés cellulaires au profit des puits présents à cette période. Par exemple, c'est durant cette phase qu'une forte protéolyse permet que l'essentiel de l'azote soit remobilisé vers les organes puits.

Les premiers organites touchés par la sénescence sont **les chloroplastes** ce qui conduit à un jaunissement des feuilles. Structurellement, la dégradation des chloroplastes se traduit par une transformation en gérontoplastes, caractérisée par une augmentation de la taille et du nombre de plastoglobules associée à une modification et à une disparition de la membrane des thylakoïdes (**Fig. II.19 ;** Zhang *et al.*, 2010*b*; Chrobok *et al.*, 2016). La dégradation de ces organites durant la sénescence se traduit par une diminution continue de l'activité photosynthétique consécutive à une diminution du fonctionnement de la chaîne de transport d'électrons des photosystèmes I et II (PSI et PSII) due à la dégradation des protéines plastidiales impliquées et à la répression des gènes responsables de leur biosynthèse (Gan et Amasino, 1997; Stessman *et al.*, 2002; Carrión *et al.*, 2014). La baisse de l'activité photosynthétique entrainera une diminution de la fixation du CO_2, déstabilisant ainsi la balance entre la

production et la détoxication des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cette déstabilisation aboutit à une forte accumulation des ROS, exposant les cellules à un stress oxydatif.

Cette perte d'activité photosynthétique accompagnée d'une accumulation de ROS est en parallèle associée à une dégradation des protéines foliaires conduisant à une remobilisation massive de l'azote puisque les protéines sont la principale forme de stockage de l'azote chez les plantes. Environ 75 % de l'azote des cellules foliaires est localisé dans les chloroplastes, majoritairement sous la forme de protéines chloroplastidiales et plus particulièrement sous la forme de ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCO), qui représente à elle seule environ 50 % de l'azote total de la feuille (Peoples et Dalling, 1988; Hörtensteiner et Feller, 2002). La dégradation des protéines chloroplastiques commence au sein des chloroplastes et se termine dans la vacuole centrale. La migration du matériel chloroplastidial se déroule alors à travers différentes voies, telle que les voies autophagiques avec les RCB (Rubisco-containing bodies ; Chiba *et al.*, 2003) ou d'autres voies indépendantes de l'autophagie et mettant en jeu les CCV (CV-Containing Vesicles ; Wang et Blumwald, 2014) ou les SAV (senescent associated vacuole ; Otegui *et al.*, 2005; Diaz-Mendoza *et al.*, 2016). Ces différentes voies nécessaires à la protéolyse seront détaillées dans la partie B.II.2.

Ensuite, **le peroxysome**, un organite impliqué notamment dans le métabolisme des acides gras et des acides aminés mais aussi dans la détoxification des ROS se multiplie et se transforme en glyoxysomes (Nishimura *et al.*, 1996). La photorespiration diminue alors tandis que les enzymes du cycle du glyoxylate sont induites. Cette évolution permet la transformation en glucide de l'Acetyl-CoA provenant de la dégradation des lipides de la membrane des thylakoïdes (Buchanan-Wollaston, 1997; Río *et al.*, 1998) et permet de fournir l'énergie nécessaire au bon déroulement de la sénescence.

B.I.1.c. Phase n°3 : Terminale

Ce n'est que durant la phase terminale que les derniers organites nécessaires au bon déroulement de la sénescence tels que la vacuole, les mitochondries et le noyau seront dégradés.

En effet, **les mitochondries** en conservant leur intégrité le plus longtemps possible, permettent de maintenir la respiration et donc la production d'ATP nécessaire au fonctionnement du processus de sénescence (**Fig. II.19 ;** Chrobok *et al.*, 2016). De même, le maintien de l'intégrité du **noyau** jusqu'à l'étape ultime de la sénescence est essentielle puisqu'il est indispensable de maintenir aussi tardivement que possible l'expression des gènes *SAGs* codant entre autre pour des enzymes nécessaires à la protéolyse et à la remobilisation (Gan et Amasino, 1997 ; Zimmermann et Zentgraf, 2005).

L'étape ultime de la sénescence qui mènera au démantèlement total de la cellule se déroule lorsque **la vacuole centrale** perdant son intégrité, libère son contenu dans le cytosol et permet aux enzymes lytiques d'avoir accès aux derniers composés cellulaires.

B.II. Les principaux acteurs de la remobilisation de l'azote associés à la sénescence

La remobilisation de l'azote associée à la sénescence est majoritairement assurée par deux grands groupes d'acteurs : les acteurs de la protéolyse et les acteurs du transport des acides aminés. Dans cette partie, nous nous intéresserons exclusivement aux systèmes protéolytiques et au trafic vésiculaire ainsi qu'aux systèmes anti-protéolytiques associés à la protéolyse, puisqu'il a été clairement démontré auparavant que le transport d'acides aminés n'est pas limitant pour la remobilisation de l'azote chez le colza (Tilsner *et al.*, 2005).

B.II.1. Les systèmes protéolytiques

Les systèmes protéolytiques impliqués dans la sénescence font intervenir une multitude de protéases. Parmi, les 800 protéases actuellement identifiées chez les plantes (Rawlings *et al.*, 2016), il existe deux grandes familles : les exopeptidases, qui coupent les liaisons peptidiques à partir d'une des extrémités (N ou C-terminale) de la protéine, et les endopeptidases, qui coupent les liaisons à l'intérieur de la chaine polypeptidique cible.

Concernant **les exopeptidases**, il en existe deux grandes classes: les aminopeptidases (clivage à partir d'un résidu situé à l'extrémité N-terminale) et les carboxypeptidases (clivage d'un résidu *via* l'extrémité C-terminale). L'implication de quelques exopeptidases dans la remobilisation de l'azote associée à la sénescence foliaire semble réelle puisque l'induction de carboxypeptidases et d'aminopeptidases ont été observées dans les feuilles sénescentes d'orge et d'*Arabidopsis thaliana* (Buchanan-Wollaston *et al*., 2005; Yang *et al.*, 2004; Parrott *et al.*, 2007; Waditee-Sirisattha *et al.*, 2011). De plus, leur présence dans les plastes suggère leur contribution dans la dégradation des protéines du stroma (Hörtensteiner et Feller, 2002). Cependant, très peu d'études montrent un rôle majeur des exopeptidases lors de la sénescence.

Les endopeptidases en revanche ont un rôle beaucoup plus avéré dans la protéolyse associée à la sénescence. Ces protéases sont réparties en plusieurs classes en fonction de l'acide aminé ou de l'ion métallique (métalloprotéases) présent dans leur site actif. Durant la sénescence, 5 classes

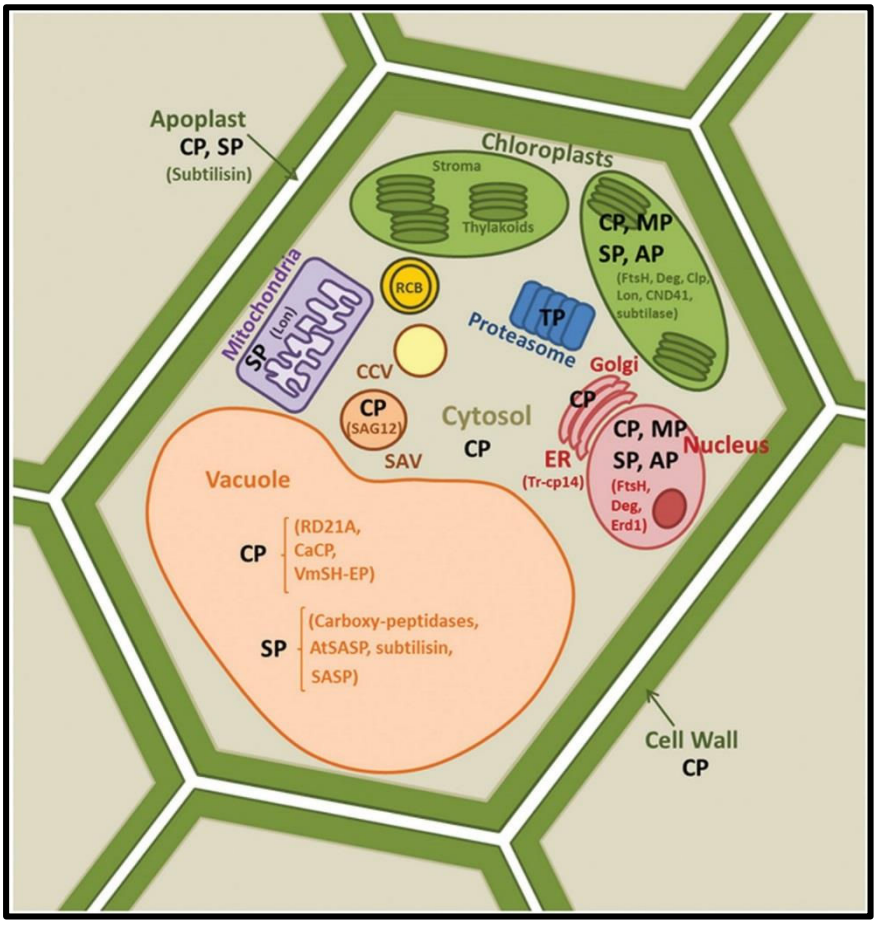


Fig. II.20. Localisation subcellulaire des principales protéases intervenant lors de la sénescence. AP : Protéases à aspartate ; CP : protéases à cystéine ; MP : Métalloprotéases ; SP : Protéases à sérine ; TP : Protéasome ; CCV : Chloroplast containing vesicles ; ER : Réticulum endoplasmique ; RCB : RuBisCO-containing bodies ; SAV : Senescence-associated vacuole (d'après Diaz-Mendoza *et al*., 2016).

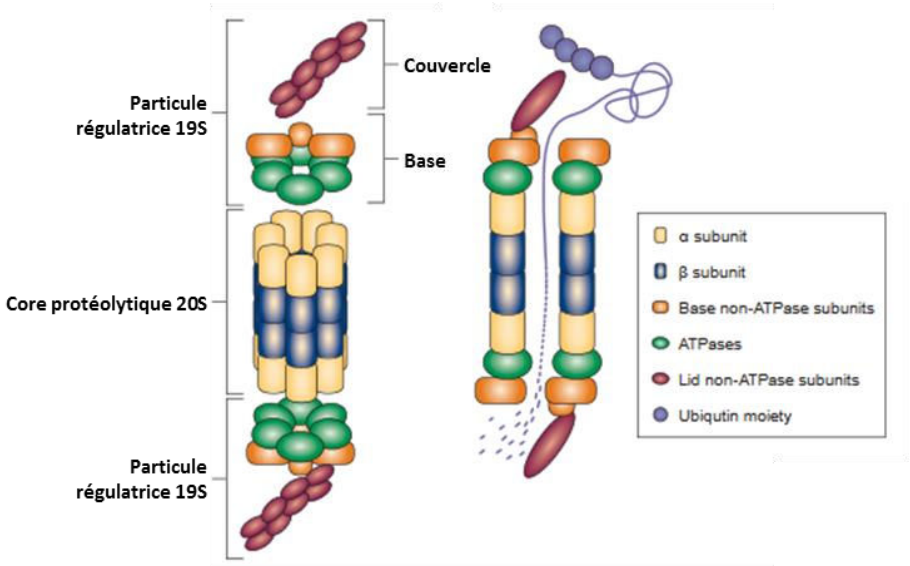


Fig. II.21. Structure et fonctionnement du protéasome 26S. Le protéasome 26S est composé d'un core protéolytique 20S et de deux parties régulatrices 19S. Les protéines ubiquitinées à dégrader sont reconnues par la partie régulatrice 19S. La protéine sera ensuite dégradée par l'action de 3 activités protéasiques ATP dépendantes portées par les sous-unités β1, β2 et β5 se trouvant dans le core protéolytique 20S (adapté de Sullivan *et al*., 2003).

d'endopeptidases vont avoir des activités et des rôles plus ou moins importants (**Fig. II.20** ; Roberts *et al.*, 2012) :

- **Les protéases à cystéine** caractérisées par une cystéine dans la triade catalytique
- **Les protéases à sérine** avec un résidu sérine dans le site actif
- **Les protéases à aspartate** qui possèdent un résidu aspartate pour catalyser la réaction
- **Les protéases à thréonine** possédant une thréonine dans le site catalytique
- **Les métalloprotéases** caractérisées par la présence d'un ion métallique (zinc notamment) au sein du site actif permettant l'hydrolyse de la liaison peptidique

Ces différentes classes vont avoir des niveaux d'inductions, des cibles et des localisations spécifiques qui seront détaillés de façon non exhaustive ci-après (**Fig. II.20**).

Parmi toutes ces endopeptidases, les protéases à thréonine et les métalloprotéases sont des protéases qui semblent avoir un rôle mineur durant de la sénescence.

Les protéases à thréonine sont connues pour être associées majoritairement au protéasome 26S. Le protéasome 26S est un énorme complexe protéolytique de plus de 700 KDa notamment responsable de la dégradation de protéines anormales, de protéines à durée de vie courte et de protéines régulatrices. Il est constitué d'une partie dite « Core 20S» constituée de 14 sous-unités α et de 14 sous-unités β dont 3 d'entre elles portent une activité protéolytique de type thréonine protéases : la sous-unité β1 à activité peptidyl glutamyl-peptide hydrolase, la sous-unité β2 à activité trypsine-like et la sous-unité β5 à activité chymotrypsine-like, et d'une ou deux parties dites régulatrices (19S) impliquées notamment dans la reconnaissance spécifique des protéines qui ont subi une ubiquitinisation préalable nécessaire pour la reconnaissance et la dégradation des cibles par le protéasome (**Fig. II.21** ; Sullivan *et al.*, 2003; Smalle et Vierstra, 2004; Moon *et al.*, 2004). Le protéasome 26S, et plus particulièrement la partie catalytique 20S conjuguée à l'ubiquitinisation, jouerait un rôle lors de la sénescence (Roberts *et al.*, 2002, 2012). En effet, chez le colza, une accumulation de la sous-unité β1 a été observée dans les feuilles sénescentes lors d'une limitation en azote (Desclos *et al.*, 2009). De plus, un lien entre l'autophagie et le protéasome a été mis en évidence à l'aide de mutants autophagiques (*atg5*) (Havé *et al.*, 2018). La localisation cytoplasmique et nucléaire des thréonines protéases (**Fig. II.21** ; Beers *et al.*, 2000) leur permet d'avoir une diversité de cibles telles que les protéines du cytoplasme, du noyau, des membranes ainsi que les protéines du réticulum endoplasmique après un transport rétrograde vers le cytoplasme (Smalle et Vierstra, 2004). Cependant, tout au long de la sénescence, l'expression et l'activité du protéasome resterait constante

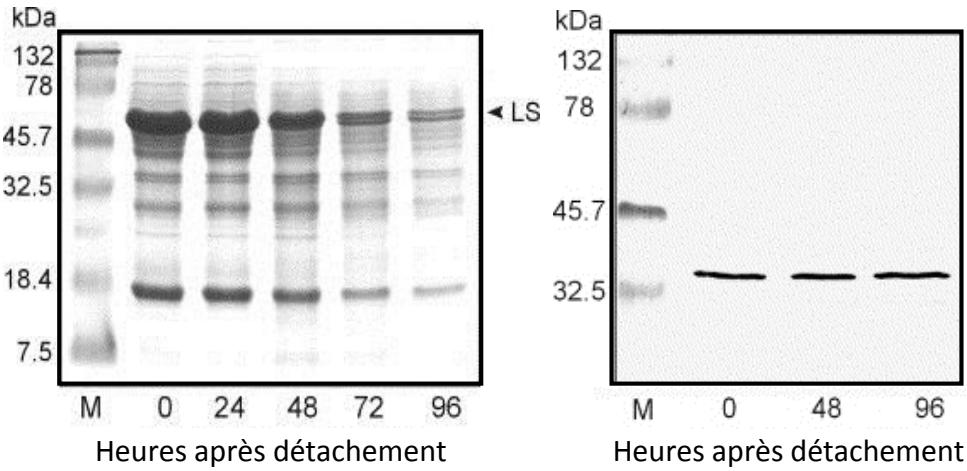


Fig. II.22. Evolution de la quantité de protéines solubles (A) et de protéasome 20S (B) dans des feuilles de blé excisées et maintenues à l'obscurité. (A) Gel SDS-PAGE d'extraits de protéines solubles et (B) western blot réalisé avec un anticorps de maïs anti-protéasome 20S. M : Marqueur de poids moléculaires. LS : Grande sous-unité de la RuBisCO (adapté de Roberts *et al*., 2002).

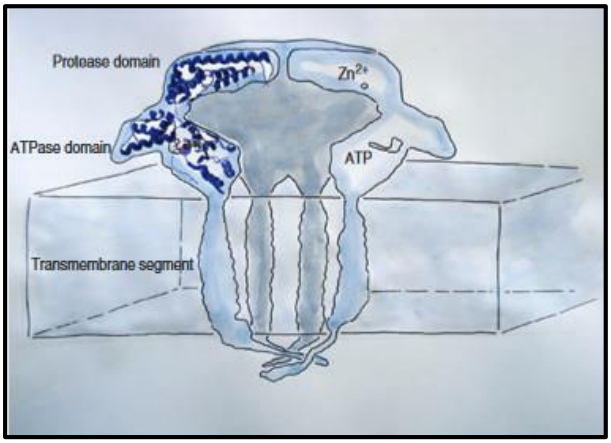


Fig. II.23. Schéma d'une coupe transversale d'un complexe hexamérique d'une protéase FtsH. Chaque sous-unité des protéases « Filamentation temperature-sensitive H » (FtsH) est composée d'un segment transmembranaire, d'un domaine ATPase et d'un domaine protéasique incluant un ion Zn^{2+} (d'après Wagner *et al*., 2012)

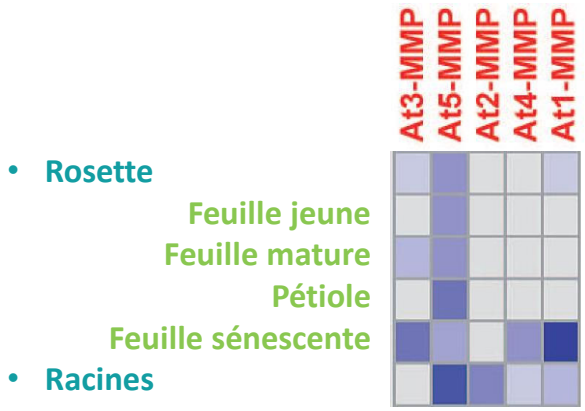


Fig. II.24. Expression génique des Matrix MetalloProtéinases (MMPs) d'*Arabidopsis thaliana*. L'expression des 5 MMPs (At1 à 5–MMP) a été suivie dans différentes feuilles de la rosette (jeunes, matures et sénescentes), dans le pétiole et dans les racines. Une forte intensité de bleu correspond à un niveau d'expression élevé. Dans les feuilles sénescentes, At1-MMP, At3-MMP, At4-MMP sont fortement exprimées (adapté de Flinn *et al*., 2008).

jusqu'au stade final supposant essentiellement un rôle de régulation de la sénescence plutôt qu'un rôle dans la remobilisation des éléments (**Fig. II.22** ; Roberts *et al.*, 2002; Avila-Ospina *et al.*, 2014).

Concernant **les métalloprotéases,** chez les plantes, il existe une centaine de membres répartis en trois sous-familles : **les « Filamentation temperature-sensitive H »** (FtsH), **les « Matrix MetalloProteinases »** (MMPs) et **les « Mitochondrial Processing-Peptidases »** (MPPs) caractérisées toutes les trois par la présence régulière d'un domaine de liaison au zinc au sein du site catalytique (Roberts *et al.*, 2012). Ces sous-familles sont induites lors de la sénescence, dont certaines lors de la sénescence foliaire du colza, telles que 2 MPPs (MPPα et β) et 2 FtsH (dont FtsH8) (Flinn, 2008; Desclos *et al.*, 2009).

Les **FtsH** sont des protéases membranaires plastidiales (**Fig. II.20 ; Fig. II.23**) dont certaines sont induites lors de la sénescence foliaire chez différentes espèces telles qu'*Arabidopsis thaliana* (Guo *et al.*, 2004), le pois (Schiltz *et al.*, 2004) ou le colza (Desclos *et al.*, 2009). Cependant, l'essentiel des travaux portant sur les FtsH montre surtout leur implication dans différentes voies métaboliques associées à la formation de chloroplastes (Adam *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010*a*), la régulation du photosystème 2 (Wagner *et al.*, 2012; Chi *et al.*, 2012) ou encore la tolérance à divers stress (Żelisko *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006)

De même, **les MPPs,** localisées dans la matrice mitochondriale seraient principalement impliquées dans la maturation de protéines mitochondriales nécessitant un clivage de pro-peptide (Kwasniak *et al.*, 2012) et dans le maintien de l'homéostasie de cet organite (Janska *et al.*, 2010). Cependant, une étude réalisée chez le colza montre que certaines MPPs sont induites en début de sénescence suggérant un potentiel rôle dans la régulation de ce processus (Desclos *et al.*, 2009). Les MMPs, localisées au niveau de la membrane plasmique et au niveau extracellulaire (Marino et Funk, 2011) sont connues pour intervenir dans la croissance et le développement, mais aussi lors de certains stress biotiques, du vieillissement et de la sénescence (**Fig. II.20 ; Fig. II.24** ; Flinn, 2008). Des travaux conduits chez des lignées d'*Arabidospis* knock-out pour une MMP montrent que l'absence de cette protéase se traduit par une diminution de la croissance et par une sénescence précoce associée à une dégradation des chlorophylles suggérant ainsi que ces protéases seraient impliquées notamment dans le développement de la plante (Golldack *et al.*, 2002). Par ailleurs, chez le concombre, Delorme *et al.*, (2000) suggèrent qu'une MMP (Cs1-MMP) induite au cours de la sénescence serait davantage impliquée dans les processus de mort cellulaire que dans la remobilisation de l'N.

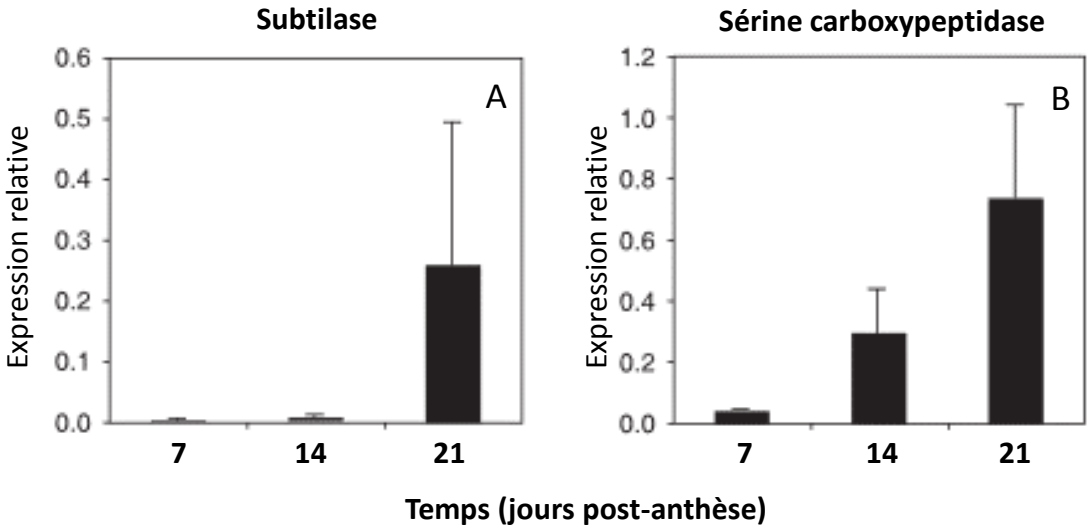


Fig. II.25. Evolution de l'expression de deux gènes codant des protéases à sérine: une subtilase (A) et une sérine carboxypeptidase (B) lors de la sénescence foliaire naturelle chez l'orge. Les feuilles ont été récoltées à 7, 14 et 21 jours après-anthèse (adapté de Parrot *et al*., 2007).

Les différentes recherches sur ces trois grandes familles de métalloprotéines suggèrent plus un rôle dans la régulation de l'initiation et du déroulement de la sénescence, plutôt que dans les processus protéolytiques associés à la remobilisation d'N. Au contraire, les trois autres classes de protéases (*i.e.* protéases à sérine, à aspartate et à cystéine) sont connues pour avoir un rôle majeur dans les processus de protéolyse associés à la sénescence.

B.II.1.a. Les protéases à sérine

Les protéases à sérine (SPs) font partie de la plus grande classe de protéases chez les plantes avec 206 membres identifiés notamment chez *Arabidopsis thaliana* (van der Hoorn, 2008). L'implication des SPs dans la remobilisation de l'N est clairement démontrée au travers de nombreux travaux. Tout d'abord, de nombreuses études, réalisées chez différentes espèces végétales (Guo *et al.*, 2004; Chauhan *et al.*, 2009; Roberts *et al.*, 2012; Havé *et al.*, 2018) dont le colza (Desclos *et al.*, 2009; Girondé *et al.*, 2016; Poret *et al.*, 2016), montrent une induction des SPs lors de la sénescence. Cette induction des SPs est particulièrement intense en réponse aux divers stress connus pour induire la sénescence et en particulier en réponse à une limitation en N (Chauhan *et al.*, 2009; Desclos *et al.*, 2009; Chichkova *et al.*, 2010; Girondé *et al.*, 2016). Chez le colza au stade végétatif, il a été montré en comparant des génotypes à ERA contrastées en condition limitante en azote, que les génotypes présentant les meilleures ERA étaient également ceux dont les niveaux d'activité SPs étaient les plus forts, suggérant ainsi que ces protéases seraient largement impliquées dans les processus de protéolyses associés à la remobilisation d'N (Girondé *et al.*, 2016).

Toutes les protéases de la famille des SPs sont classées en 3 grandes sous-familles ayant toutes un rôle démontré ou supposé lors de la sénescence : **les subtilisin-like protéases** (Sub-Ls), **les protéases caséinolytique** (Clps) et **les « degradation of periplasmic proteins »** (Degs)

Les subtilisin-like protéases (Sub-Ls) comptent au total environ 70 membres identifiés à partir du génome d'*Arabidopsis thaliana* (van der Hoorn, 2008). Même si aucun phénotype n'a pu être observé pour plus d'une cinquantaine de lignées knock-out pour différentes Sub-Ls, probablement du fait d'une redondance fonctionnelle des différents membres de cette famille (Rautengarten *et al.*, 2005), leur implication dans la remobilisation de l'N a été démontrée dans de nombreuses études. Ainsi, 2 sub-Ls de blé (P1 et P2) et trois de l'orge (HvSBT2, HvSBT3 et HvSBT6) ont été identifiées comme étant accumulées durant la sénescence foliaire induite ou non par des facteurs abiotiques (obscurité, limitation en N) ou hormonaux (Ethylène et MeJA) (**Fig. II.25** ; Roberts *et al.*, 2006, 2017; Parrott *et al.*, 2007). Les 2 Sub-Ls P1 et P2 ont par ailleurs été identifiées comme étant des acteurs majeurs de la remobilisation au moment du

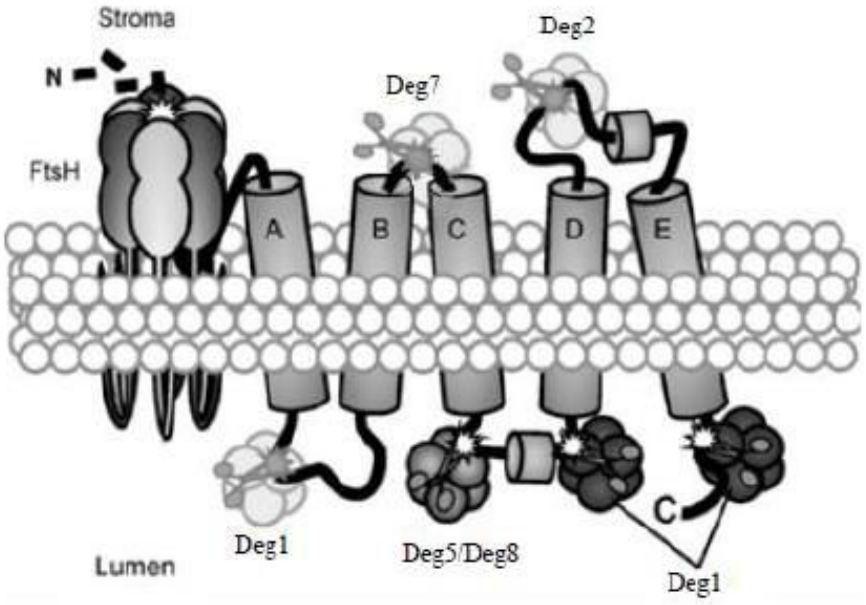


Fig. II.26. Modèle proposé pour la protéolyse de la protéine D1 du PSII par les Deg protéases. La protéine D1 est clivée coté lumen par les protéases Deg1 et le complexe Deg5/Deg8. Dans le stroma, D1 est dégradée par les protéases Deg2 et Deg7. Enfin les fragments de D1 sont complètement dégradés par des métalloprotéases FtsH. Les domaines transmembranaires de D1 sont indiqués (A à E) (adapté de Kato et Sakamoto, 2009; Sun *et al.*, 2010a).

remplissage des grains (Roberts *et al.*, 2011). Une autre Sub-Ls chez *Arabidopsis thaliana*, (AtSASP) est accumulée lors de la sénescence avec une activité qui augmente surtout au stade reproducteur (Martinez *et al.*, 2015). Chez le colza, l'utilisation de sondes spécifiques de la classe des SPs (van der Hoorn et Kaiser, 2012), a permis d'identifier 4 Sub-Ls (S8) exprimées au cours de la sénescence foliaire naturelle ou induite par une limitation en azote (Poret *et al.*, 2016).

Les protéases caséinolytiques (Clps) sont principalement des protéases plastidiales abondantes dans le stroma (Roberts *et al.*, 2012). Elles sont généralement constituées d'un complexe fonctionnel composé de deux sous-unités : un noyau catalytique et une sous-unité chaperonne, avec une activité ATPase responsable de la reconnaissance, du déploiement et de la translocation du substrat dans le compartiment protéolytique. La ressemblance structurale des Clps avec le protéasome leur a valu un rôle supposé dans la dégradation des protéines plastidiales anormales, endommagées ou à courte durée de vie (Kato et Sakamoto, 2010). Chez *Arabidopsis thaliana*, ce rôle supposé a été conforté par des travaux montrant une expression constitutive de plusieurs Clps (ClpP1-3, ClpP5-6, ClpR3 et ClpR4) dans les chloroplastes de plantes cultivées à l'obscurité (Lin et Wu, 2004). Cependant, dans ces mêmes conditions, il a aussi été montré que d'autres Clps (ClpD/ERD1 et ClpC1) étaient induites et participaient à la protéolyse associée à la sénescence. Cette induction lors de la sénescence a également été mise en évidence chez différentes espèces, et notamment lorsque la sénescence est induite par une contrainte azotée (Guo *et al.*, 2004; Schiltz *et al.*, 2004; Ruuska *et al.*, 2008).

Les « degradation of periplasmic proteins » (Degs) est une petite famille de SPs avec seulement 16 protéases identifiées chez *Arabidopsis thaliana*. Elles sont connues pour participer à la dégradation de nombreuses sous-unités du PSII dont la protéine D1 (**Fig. II.26** ; Kato et Sakamoto, 2009; Sun *et al.*, 2010*b*,*a*; Schuhmann et Adamska, 2012). De plus, il a été montré que parmi les 5 membres des Degs protéases localisés dans la lumière des thylakoïdes (Degs 1, 5 et 8) ou dans la membrane du thylakoïde (Deg 2 et 7), Degs 1 et 2 d'*Arabidopsis thaliana* sont impliquées dans la dégradation de plusieurs protéines de type light-harvesting chlorophyll-binding telles que lhcb 4, 5 et 6 (Luciński *et al.*, 2011*b*; Zienkiewicz *et al.*, 2012). Chez la même espèce, des mutants KO-Deg2 et KO-Deg5 présentent un retard d'entrée en sénescence (Luciński *et al.*, 2011*a*, *b*). Cependant, lors d'une exposition à l'obscurité, d'autres auteurs ont observé une diminution de l'expression des protéases Degs 1, 2 ,5 et 8 durant la sénescence foliaire remettant ainsi en cause leur rôle dans ce processus (Lin et Wu, 2004). Ainsi, à ce jour, l'implication des Degs protéases dans la protéolyse associée au processus de sénescence foliaire n'est pas claire.

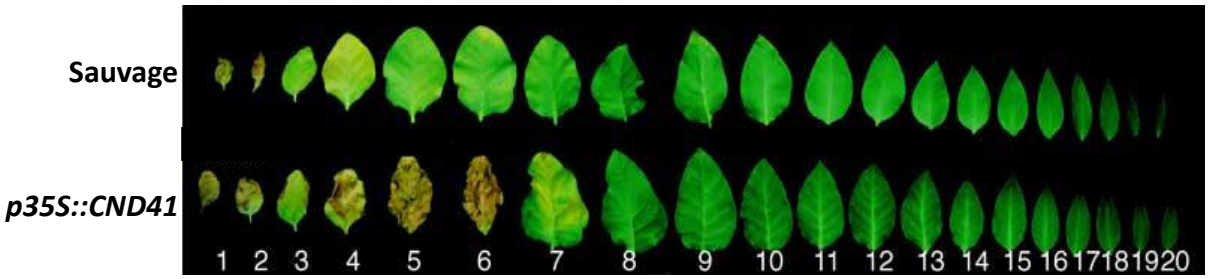


Fig. II.27. Accélération de la sénescence par la surexpression de la protéase CND41 chez le tabac. Des symptomes visuels de sénescence sont observés jusqu'à la feuille 6 chez les surexpresseur de CND41 (*p35S::CND41*), alors que la feuille témoin à la même position conserve une couleur verte (adapté de Kato *et al*., 2005).

Concernant leur localisation cellulaire, les SPs sont présentes dans tous les organites d'une cellule avec cependant une très forte présence dans les plastes et dans les organites à pH neutre (**Fig. II.20**). Ainsi, **des Degs protéases** ont été localisées dans les mitochondries (Degs 3, 4, 6, 10, 11, 12 et 14), les chloroplastes (Degs 1, 2, 5, 7 et Deg8), le noyau (Deg 9), les peroxysomes (Deg 15), le réticulum endoplasmique (Deg13). D'autres Degs (7 et 13) ont également été localisées respectivement au niveau du cytoplasme et de la membrane plasmique (Adam *et al.*, 2001; Schuhmann et Adamska, 2012). **Les Clps** sont pour la plupart localisées dans le stroma des chloroplastes même si certains auteurs ont pu en identifier dans d'autres organites tels que les mitochondries (ClpB1 et ClpP2 ClpB4, par exemple) ou le noyau (Adam *et al.*, 2001; Kato et Sakamoto, 2010; Roberts *et al.*, 2012). Enfin, **les « subtilisines-like proteases »** sont également principalement localisées dans les chloroplastes même si certaines protéases de cette sous-classe ont été localisées dans les vacuoles et l'apoplaste (Martínez et Guiamet, 2014).

B.II.1.b. Les protéases à aspartate

Les protéases à aspartates (APs) appartiennent après les protéases à sérine à la deuxième plus grande famille de protéases avec un total de plus de 158 gènes identifiés dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* (Schaller, 2004; van der Hoorn, 2008). Plusieurs APs sont induites durant la sénescence foliaire naturelle chez de nombreuses espèces végétales telles que le colza (Buchanan-Wollaston et Ainsworth, 1996; Desclos *et al.*, 2009), le blé (Gregersen et Holm, 2007), le riz (Liu *et al.*, 2008) et *Arabidopsis thaliana* (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Diaz *et al.*, 2008; Kato et Sakamoto, 2010; Havé *et al.*, 2018). Chez le colza, des études ont également montré qu'une isoforme d'AP (gi :1326165) est également induite au cours de la sénescence foliaire induite par une limitation en N, cette expression étant durable puisque cette protéase est retrouvée en forte quantité dans les feuilles chutées (Desclos *et al.*, 2009; Desclos-Théveniau *et al.*, 2015; Girondé *et al.*, 2016). Cependant, le(s) rôle(s) supposé(s) des APs dans les processus de sénescence reste méconnu.

Dans la sous-famille des **phytepsines,** la protéase chloroplastique **CND41** (Chloroplast Nucleoid DNA-binding protein 41 ; Nakano *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 2000) est l'une des seules dont le rôle pendant la sénescence a été caractérisé. Ainsi, chez *Nicotiana tabacum,* l'implication de CND41 dans la dégradation de la RuBisCO a été démontrée *in vitro* (Kato *et al.*, 2004, 2005; Diaz *et al.*, 2008). Par ailleurs, une étude réalisée sur des lignées de plantes Knock-Out pour CND41 montre une accumulation de la RuBisCO associé à un retard dans l'initiation de la sénescence alors qu'au contraire, des travaux réalisés sur des lignées sur-exprimant cette AP montrent une dégradation de la RuBisCO et une initiation de la sénescence accélérées (**Fig. II.27** ; Kato *et al.*, 2004, 2005). Chez *Arabidopsis thaliana*, il a été montré que

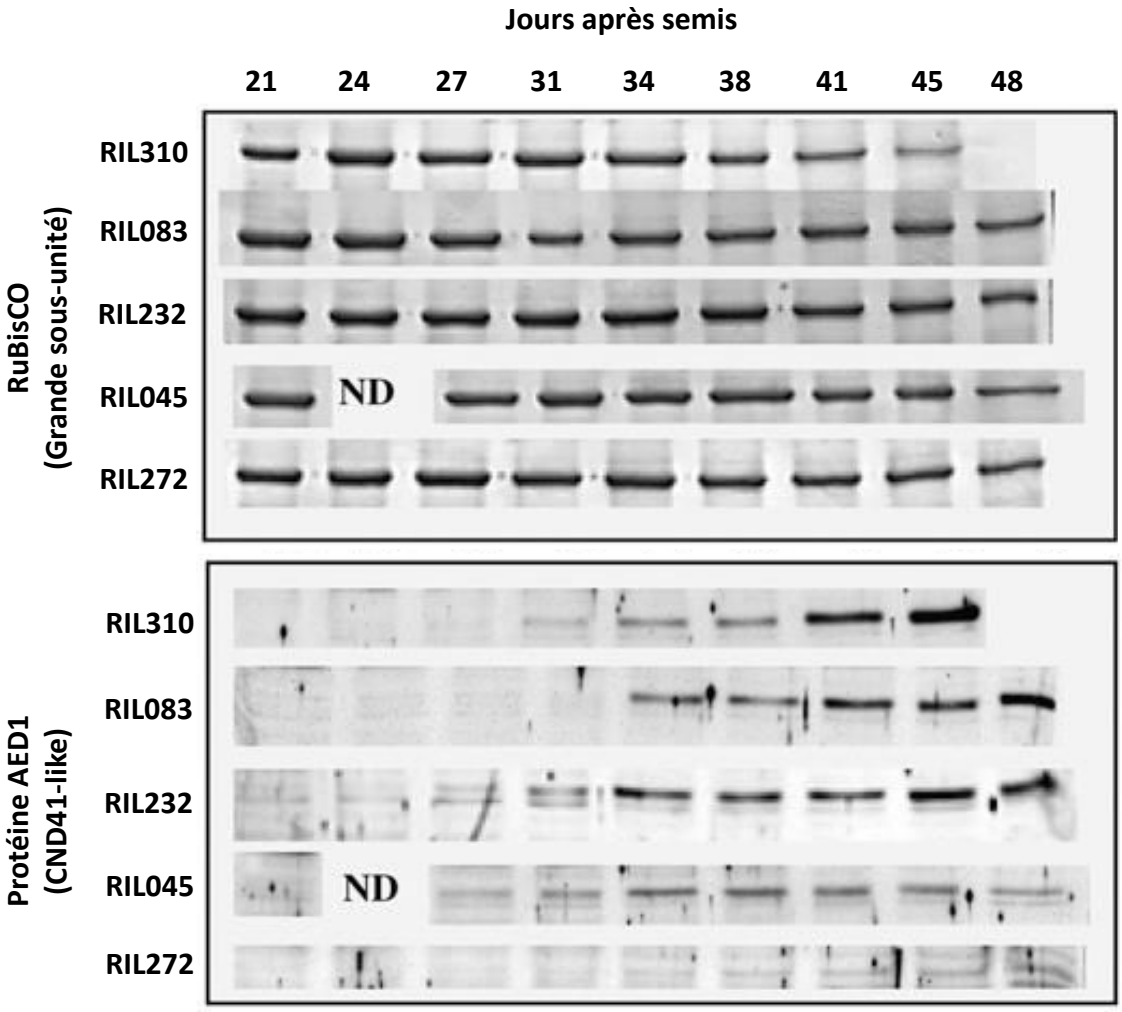


Fig. II.28. Evolutions antagonistes des quantités foliaires de la protéase AED1 (CND41-like) et de la grande sous-unité de la RuBisCO. L'analyse a été réalisée sur un lot de feuilles issues de lignées recombinantes fixées *d'Arabidopsis thaliana* (RIL310; RIL083; RIL232; RIL045; RIL272) présentant des vitesses de sénescence contrastées. Les western-blot ont été réalisés avec un anticorps anti-CND41 de tabac et anti-grande sous-unité de la RuBisCO (adapté de Diaz *et al*., 2008)

l'augmentation de l'expression foliaire de la protéase à aspartate AED1 (considérée comme une CND41-like) est corrélée à la diminution de la RuBisCO (**Fig. II.28** ; Diaz *et al.*, 2008). Plus récemment, Havé et collaborateurs (2018) ont montré, que comparées aux plantes sauvages, des mutants d'autophagie (knock-Out pour le gène *atg5*) cultivés sous contrainte N, accumulent la protéase à aspartate AED1 (x 3.33 fois) dans leurs feuilles sénescentes. L'ensemble de ces résultats renforce l'hypothèse que cette sous famille d'APs joue un rôle majeur dans la protéolyse de protéines plastidiales, mais également dans les processus de mort cellulaire associés à la sénescence (Havé *et al.*, 2018).

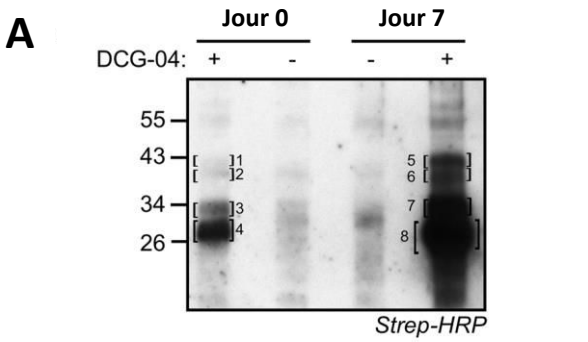
Les APs sont principalement localisées au niveau plastidiale (**Fig. II.20** ; Nakano *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 2000) même si certaines isoformes de phytepsines ont également été retrouvées dans les vacuoles (Runeberg-Roos et Saarma, 1998), la paroi et la matrice extracellulaire (Vieira *et al.*, 2001).

B.II.1.c. Les protéases à cystéine

Les **protéases à cystéines (CPs)** appartiennent à la classe de protéases la plus surexprimée lors de la sénescence foliaire naturelle ou induite chez de nombreuses espèces et notamment le colza (Buchanan-Wollaston et Ainsworth, 1996; Guo *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2007; Roberts *et al.*, 2012, Girondé *et al.*, 2016; Poret *et al.*, 2016). A titre d'exemple, chez le colza, une étude conduite sur plusieurs génotypes de colza à ERA contrastées a permis de mettre en évidence qu'une remobilisation d'N efficiente était associée à une forte activité des CPs (Girondé *et al.*, 2016).

Les CPs actives pendant la sénescence appartiennent à 3 sous-familles : **les « Papain-Like Cystein Proteases »** (PLCPs), **les MétaCaspases** (MC) et **les « Vacuolar Processing Enzymes »** (VPE).

La famille des « papain-like cystein proteases » (PLCPs) est composée de 138 membres retrouvés dans le génome des plantes (Richau *et al.*, 2012). Les PLCPs ont la particularité d'être synthétisées sous la forme d'une pré-protéine portant différents peptides signaux permettant leur adressage dans différents compartiments subcellulaires. Au sein de leur séquence, ces PLCPs possèdent également un pro-domaine peptidique auto-inhibiteur qui empêche une activation prématurée de la protéase nécessitant d'être clivé pour que la protéase devienne active (van der Hoorn *et al.*, 2004; Richau *et al.*, 2012). Elles sont les principales protéases associées à la dégradation massive des protéines durant la sénescence (Parrott *et al.*, 2010). Lors de la sénescence foliaire du colza, de nombreuses PLCPs sont surexprimées parmi lesquelles RD21, XBCP3, AALP, **SAG12-1**, **SAG12-2**, SAG2 (Noh et Amasino, 1999*a*; Poret *et al.*, 2016). Ces mêmes PLCPs sont également surexprimées au cours de la sénescence foliaires d'*Arabidopsis thaliana* au côté d'autres représentants de cette même famille tels que RD19, la cathepsin-B ou RDL2 par exemple



B

N° d'accession	At1g47128	At5g43060	At3g19390	At3g19400	At4g35350	At1g20850	At5g45890	At4g16190	At5g60360	At3g45310	At1g02300	At1g02305	At4g01610
Nom de la protéase	RD21A	RD21B	RD21C	RDL2	XCP1	XCP2	SAG12	RD19C	AALP	ALP2	CTB1	CTB2	CTB3
Band 1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Band 2	5	0	0	0	5	3	0	0	0	0	0	7	16
Band 3	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	2
Band 4	13	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Band 5	6	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Band 6	12	0	3	0	0	0	0	2	0	0	0	0	10
Band 7	17	2	3	4	0	0	2	3	4	0	3	7	31
Band 8	12	0	4	7	0	0	8	4	36	8	0	0	11

Nombres de spectres

Fig. II.29. Induction des PLCPs (dont SAG12) dans des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* dont la sénescence a été induite par une exposition à l'obscurité. Les différentes PLCPs ont été purifiées à l'aide de la sonde DCG04 spécifiques des PLCPs et séparées sur un gel SDS-PAGE (A). Chacune des 8 bandes a été séquencée par MS/MS et un comptage du nombre de spectres correspondant à chacune des différentes PLCPs a été réalisé (B) (adapté de Pružinská *et al*., 2017).

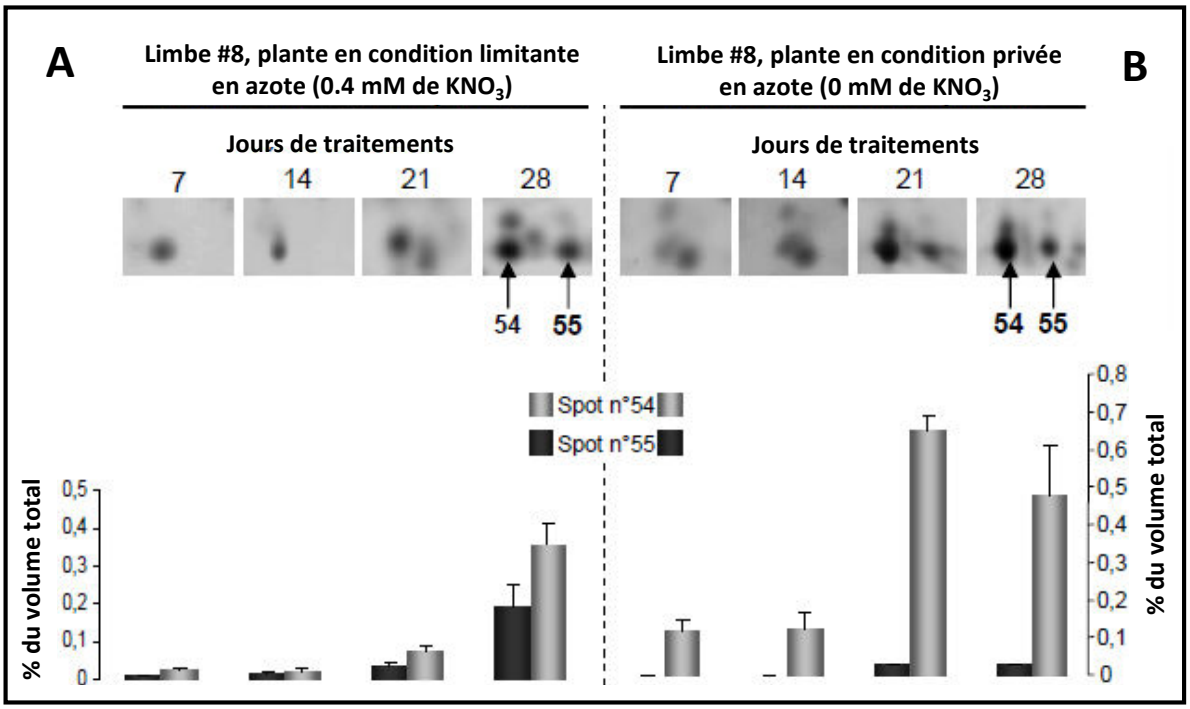


Fig. II-30. Quantification de la protéase SAG12-1 dans un limbe sénescent (rang 8) de colza cultivé en condition limitante (0,4 mM de KNO_3 ; A) ou privée (0 mM de KNO_3 ; B) en azote. Une électrophorèse bidimensionnelle à été réalisée à partir de protéines solubles extraites des limbes de feuilles du rang 8. Les spots 54 et 55 correspondent à la protéase à cystéine SAG12-1. Leur quantification à été réalisée l'aide du logiciel ProXpress et normalisée par rapport à la quantification total des spots de l'ensemble des protéines présentes sur le gel (% du volume total) (adapté de Desclos *et al*., 2009).

(**Fig. II.29** ; Grbić, 2003; Guo *et al.*, 2004; Pružinská *et al.*, 2017). En plus d'être surexprimées en condition de sénescence naturelle, certaines de ces PLCPs le sont également en conditions de sénescence induite par un stress (Gombert *et al.*, 2006; Poret *et al.*, 2016). Les membres de cette famille de protéases à cystéine étant nombreux, il est difficile de faire une analyse exhaustive de l'implication et du rôle de chacune de ces PLCPs au cours de la sénescence foliaire. Ainsi, le choix a été fait de s'intéresser plus particulièrement au cours de ce travail de thèse à la protéase à cystéine la plus fortement induite au cours de la sénescence foliaire chez de nombreuses espèces végétales (Buchanan-Wollaston et Ainsworth, 1996; Noh et Amasino, 1999*b*; Guo *et al.*, 2004; Roberts *et al.*, 2012; Girondé *et al.*, 2016; Poret *et al.*, 2016), la PLCP **SAG12**.

La protéase **SAG12** est une protéine présente chez une multitudes d'espèces telles que le riz, le tabac, le colza et *Arabidopsis thaliana* (Guo *et al.*, 2004; Desclos *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2013, 2016; Li *et al.*, 2017). Elle n'est représentée qu'une fois dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* mais 2 orthologues sont retrouvés chez le riz (***OsSAG12-1*** et ***OsSAG12-2***) et chez *Brassica napus* (***BnaSAG12*-1** et ***BnaSAG12-2***) (Noh et Amasino, 1999*a*; Singh *et al.*, 2013, 2016). Son promoteur, dit spécifique de la sénescence, peut être induit par divers stress abiotiques et réprimé par différentes phytohormones et molécules liées au développement tel que les cytokinines, l'auxine, les sucres… (Noh et Amasino, 1999*b*; Desclos *et al.*, 2008; Dubousset *et al.*, 2009; Desclos-Théveniau *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2017). L' expression de SAG12 a été trouvée dans la plupart des organes (feuilles, tiges, siliques, pétales) qui rentrent en senescence (Grbić, 2002 ; 2003; Poret, 2016). Chez le colza, la protéase **SAG12** est surexprimée relativement précocement et durablement (elle est encore largement présente dans le protéome de feuilles chutées ; Desclos-Théveniau et al., 2015) aussi bien durant la sénescence foliaire naturelle que durant la sénescence induite où elle est, par exemple, particulièrement induite par un stress N (**Fig. II.30** ; Gombert *et al.*, 2006; Desclos *et al.*, 2009; Poret, 2016). Compte-tenu de toutes ces informations, tout suggère qu'elle constituerait une protéase absolument essentielle au bon déroulement de ce processus et pourrait être un déterminant majeur conditionnant l'ERA (Girondé *et al.*, 2016; Poret *et al.*, 2016). Pourtant, d'autres études réalisées sur *Arabidopsis thaliana* montrent que des lignées Knock-Out pour le gène **SAG12** (Otegui *et al.*, 2005) ne présentent aucune différence de progression des symptômes foliaires de senescence avec la lignée sauvage. Ces travaux montrent également que l'absence de cette protéase n'a aucun impact sur la formation des « Senescent Associated Vacuoles » (SAV, décrites plus en détail dans la partie §B.II.2.b.i) dans lesquelles **SAG12** à précédemment été localisée (Otegui *et al.*, 2005). Par ailleurs, une autre étude réalisée chez le riz montre même que l'absence de la protéine **SAG12** permet une accélération de la sénescence, suggérant ainsi que cette protéase à cystéine serait en fait un régulateur négatif de la

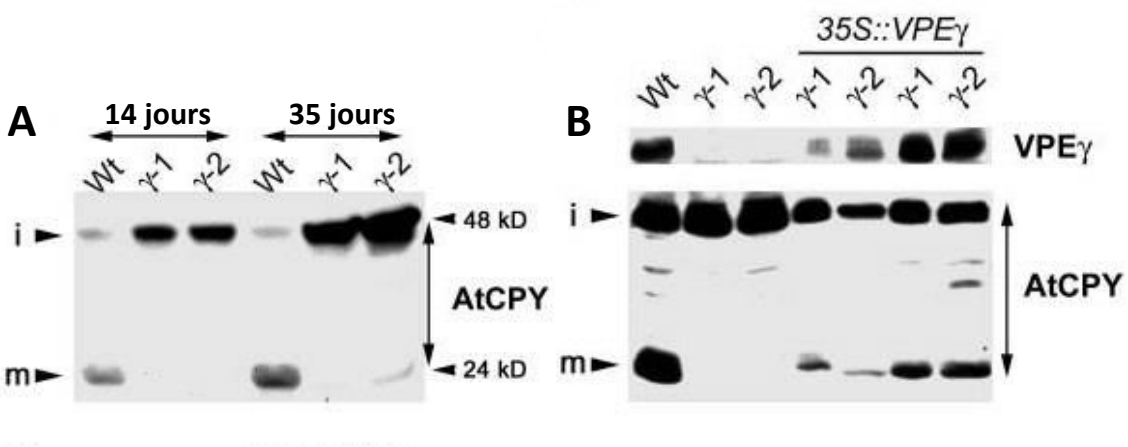


Fig. II.31. Rôle de la Vacuolar Processing Enzyme (VPEγ) dans la maturation d'une carboxypeptidase (AtCPY). Les analyses ont été réalisées par western-blot avec des anticorps anti-VPEγ et anti-AtCPY. Une accumulation de la forme mature de la protéase AtCPY (48 kD) au détriment de la forme immature (24 kD) est observée lorsque les plantes n'expriment plus VPEγ (Knock out VPEγ : γ-1 et γ-2) (A). Lorsque ces lignées knock-out sont complémentées par une VPEγ sous contrôle d'un promoteur 35S (35S::VPEγ), le phénotype sauvage présentant une maturation de la carboxypeptidase (AtCPY) est recouvré (B). i : immature ; m : mature (adapté de Rojo *et al*., 2003).

sénescence foliaire en réprimant notamment l'expression de certains gènes *SAGs* (Singh *et al.*, 2013). A la lumière de ces dernières études, il apparaît donc que le rôle de la protéase **SAG12** durant la sénescence foliaire reste à ce jour controversé.

Les « Vacuolar Processing Enzymes » (VPEs) sont une classe de protéases à cystéines à activité caspase 1-like, responsables de la maturation de protéases vacuolaires mais aussi de la rupture de la vacuole lytique lors de la phase n°3 (dite terminale) de la sénescence (Cf. §B.I.1.c) (Hara-Nishimura et Hatsugai, 2011). Chez *Arabidopsis thaliana*, deux membres des VPEs voient leur expression particulièrement induite lors de la sénescence : αVPE et γVPE (**Fig. II.31** ; Kinoshita *et al.*, 1999; Rojo *et al.*, 2003; Roberts *et al.*, 2012). De plus, il a été démontré que les VPEs sont davantage impliquées dans l'activation de protéases telles que AtCPY (Rojo *et al.*, 2003) que dans la dégradation de protéines comme la RuBisCO, fortement dégradées lors de la sénescence. En effet, des travaux réalisés sur des lignées d'*Arabidopsis thaliana* transformantes KO ou sur-exprimant des VPEs ont permis de montrer que le niveau d'expression de ces protéases à cystéine n'avait aucun impact sur le taux de dégradation de la RuBisCO au cours de la sénescence foliaire (Pružinská *et al.*, 2017). Le rôle précis de ces protéases durant la sénescence reste donc pour le moment encore mal connu.

Les MétaCaspases (MCs) sont une petite famille de protéases à cystéine composée de seulement 9 membres identifiés au sein du génome d'*Arabidopsis thaliana* (Roberts *et al.*, 2012) : 3 du type I (AtMC1 à 3) et 6 du type II (AtMC4 à 9 ; Tsiatsiani *et al.*, 2011). Diverses études montrent une implication des MCs lors du processus de mort programmée de la cellule (Programmed Cell Death ; PCD), notamment au cours du développement (Watanabe et Lam, 2011). Ainsi, la MC AtMC9 serait impliquée dans la mort cellulaire du xylème pour la formation des trachéides chez *Arabidopsis thaliana* (Bollhöner *et al.*, 2013; Escamez *et al.*, 2016). Même si plusieurs gènes de MCs (*MC6* et *MC9*) sont clairement induits au cours de la sénescence foliaire chez *Arabidopsis thaliana* (Breeze *et al.*, 2011), le rôle de ces protéases durant la sénescence reste encore largement méconnu.

Leur activité optimale étant généralement à pH acide (van der Hoorn *et al.*, 2004; Diaz-Mendoza *et al.*, 2016), les CPs sont essentiellement localisées dans les vacuoles même si une étude réalisée par Beers *et al.,* (2004) suggèrent que certaines CPs pourraient avoir une localisation plastidiale. Les **PLCPs** sont principalement localisées dans les SAVs (**SAG12**, par exemple ; Otegui *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2008; Carrión *et al.*, 2013, 2014) ou la vacuole centrale (RD21, par exemple ; Yamada *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2007)) (**Fig. II.20**). Les **VPEs**, comme leur nom l'indique, seront également spécifiquement localisées dans les vacuoles où elles assurent la maturation de protéases vacuolaires et participent à la rupture de la

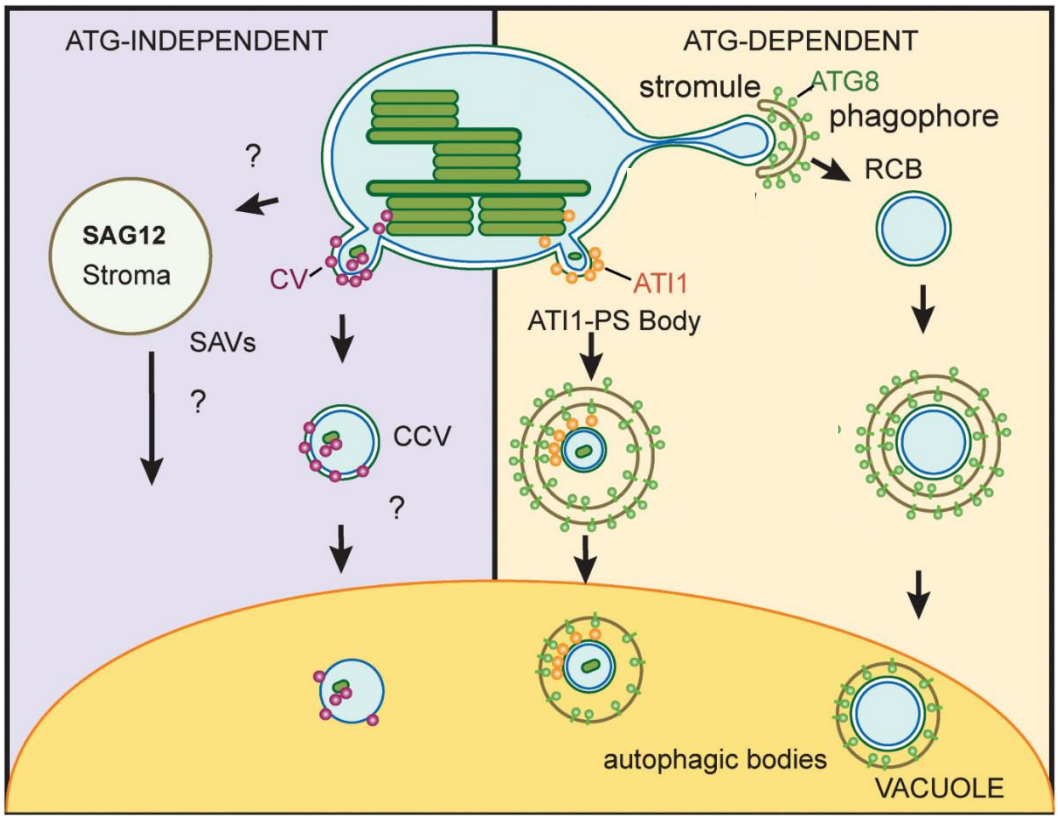


Fig. II-32. Schéma hypothétique du trafic vésiculaire associé à l'exportation de matériel chloroplastique pour sa dégradation dans les vacuoles. Deux voies indépendantes de l'autophagie (ATG-independent) sont représentées à gauche (mauve) : une voie mettant en jeu les Senescence-Associated Vacuoles (SAVs) et une autre mettant en jeu les CV-containing vesicles (CCVs). Les mécanismes impliqués dans la biogenèse des SAVs ainsi que les caractéristiques ultrastructurales des CCVs (membrane double *vs* membrane unique, présence de membranes thylakoïdiennes à l'intérieur) sont actuellement inconnus. Deux voies dépendantes de l'autophagie (ATG-dépendent) sont représentées à droite (jaune clair) : une première impliquant les RuBisCO-containing bodies (RCBs) et une seconde impliquant les corps autophagiques ATG8-INTERACTING PROTEIN 1 PoSitive (ATI1-PS). Ces deux voies nécessitent l'intervention de protéines ATG8 (adapté de Otegui *et al*., 2018).

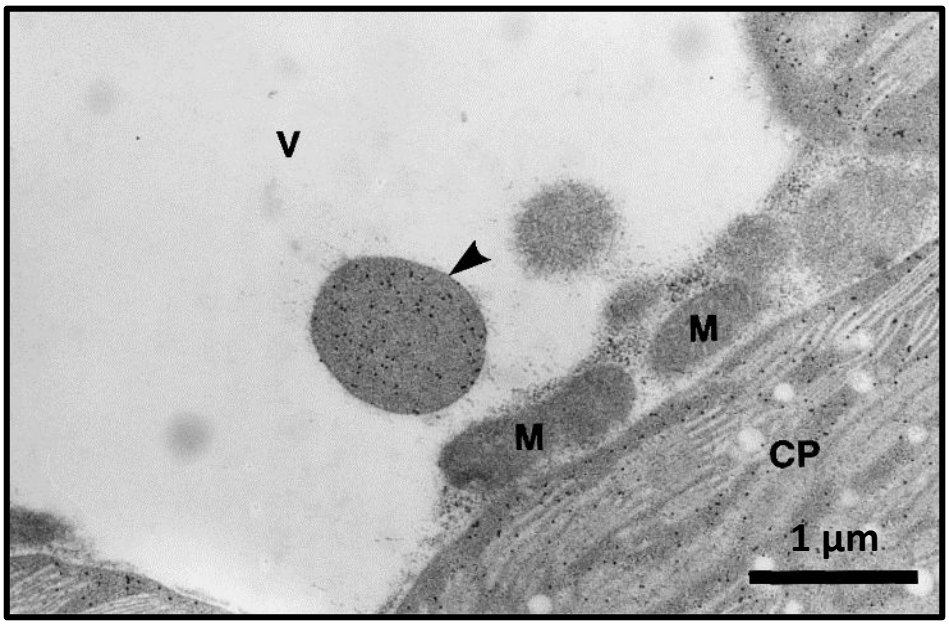


Fig. II-33. Ultrastructure d'un « RuBisCO-Containing Bodie » (RCB) dans la vacuole d'une cellule du mésophile d'une feuille de blé âgée de 21 jours. La grande sous-unité de la RuBisCO a été détectée avec un anticorps Anti RuBisCO couplé à des billes d'or. La flèche indique la localisation du RCB. CP : Chloroplaste, M : Mitochondrie, V : Vacuole (adapté de Chiba *et al*., 2003).

paroi vacuolaire (Kinoshita *et al.*, 1999; Lam, 2005; Hara-Nishimura et Hatsugai, 2011). Concernant les **MCs**, elles ont été localisées dans le noyaux (AtMC3) et dans le cytoplasme (AtMC9) (Kwon et Hwang, 2013).

B.II.2. Trafic vésiculaire associé à la protéolyse.

Comme nous venons de le voir, les protéases ont des localisations subcellulaires différentes en fonction de leurs cibles et de leur pH optimal d'activité. Ainsi, la dégradation totale d'une protéine nécessitera le plus souvent l'intervention de plusieurs protéases ayant des localisations subcellulaires différentes. A titre d'exemple, en dépit de la présence de nombreuses protéases localisées dans les chloroplastes, la dégradation des protéines plastidiales au cours de la sénescence est essentiellement réalisée au sein de la vacuole. Dans ce contexte, la protéolyse des protéines chloroplastidiales est rendue possible par l'existence d'un trafic vésiculaire empruntant des voies dépendantes ou non de l'autophagie (**Fig. II.32**).

B.II.2.a. Le trafic vésiculaire dépendant de l'autophagie

L'autophagie correspond à un trafic impliquant des vésicules permettant le transport des composés cellulaires, des organites ou de leurs composants vers des vacuoles pour y être dégradés. Les vésicules autophagiques puisent les ressources nécessaires à la formation de leurs membranes au sein du réticulum endoplasmique (Otegui, 2018). Elles sont essentielles à la protéolyse associée à la remobilisation de l'N lors de la sénescence (Guiboileau *et al.*, 2012; Ishida *et al.*, 2014; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2017). En effet, des plantes d'*Arabidopsis thaliana* mutantes Knock-Out pour des gènes impliqués dans l'autophagie, à savoir *atg5* et *atg9* voient leur remobilisation en N fortement diminuée du fait d'une protéolyse inefficace conduisant à une accumulation de protéines et de peptides non dégradées (Guiboileau *et al.*, 2012, 2013). Deux corps vésiculaires autophagiques différents (RCBS et ATI-PS bodies), impliqués dans la dégradation de protéines plastidiales (chlorophagie) sont décrits ci-dessous (**Fig. II.32**) :

B.II.2.a.i. Rubisco-Containing Bodies (RCBs)

Les RCBS sont des corps autophagiques d'environ 0,5 à 1 µm de diamètre à double membranes contenant des protéines plastidiales telles que de la RuBisCO, la glutamine et des composants de la membrane thylakoidienne (**Fig. II.33** ; Chiba *et al.*, 2003). Ils sont présents dans le cytoplasme des cellules de feuilles sénescentes et se forment à partir de stromules élaborés à partir de l'enveloppe plastidiale. Ainsi, chez des plantes KO-*atg5* et KO-*atg7*, plusieurs études ont montré que les RCBs restaient solidaires

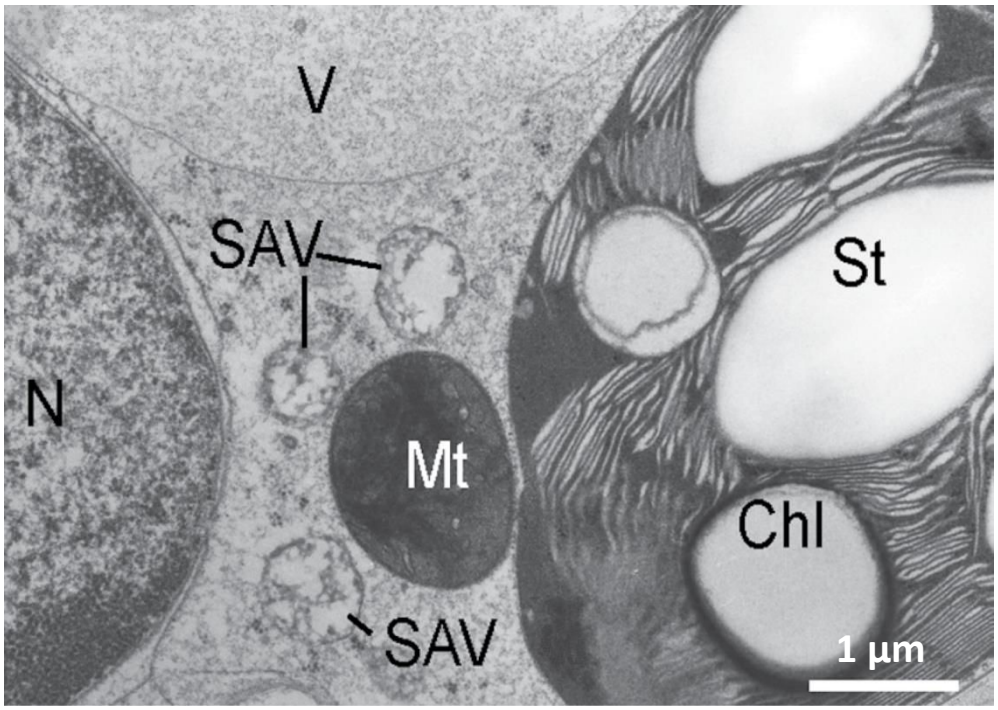


Fig. II.34. Ultrastructure d'une cellule de feuille de pois sénescente mettant en évidence la présence de « Senescence Associated Vacuoles » (SAVs) dans le cytoplasme. Chl : chloroplaste ; Mt : mitochondrie ; N : noyau ; St : amidon ; V : vacuole (adapté de Chiba *et al*., 2003).

des stromules et n'arrivaient pas à être libérés dans le cytoplasme. Ces travaux montrent que l'expression de gènes liés à l'autophagie (*Atg5* et *Atg7*) est essentiel dans la formation des RCBs (Ishida *et al.*, 2008; Spitzer *et al.*, 2015).

B.II.2.a.ii. ATI1-PS bodies

Contrairement aux RCBs, les ATI1-PS bodies sont des corps autophagiques beaucoup plus petits (50-100 nm) se formant par bourgeonnement à la surface des chloroplastes. Leur formation à lieu dans les cellules de feuilles sénescentes et ne nécessite pas l'intervention préalable de stromules ni l'expression de gènes de type *ATG* (Michaeli *et al.*, 2014). Une protéine ATI1 (ATG8-INTERACTING PROTEIN1) va permettre le recrutement de protéines plastidiales (protéines du stroma, de l'enveloppe des chloroplastes et des thylakoïdes) au sein du corps autophagique et va également interagir avec ATG8 permettant le ciblage du corps autophagique vers la vacuole. En effet, les ATI1-PS bodies ont tout de même besoin de la machinerie ATG pour se décharger dans la vacuole. Cependant, une déficience en protéine ATI1 n'impacte pas la dégradation de la RuBisCO montrant que ces vésicules ne participent pas à sa protéolyse (Michaeli *et al.*, 2014).

B.II.2.b. Le trafic vésiculaire indépendant de l'autophagie

Toutes les voies de dégradation des protéines plastidiales ne font pas appel à l'autophagie. En effet, deux autres voies ont été mises en évidence et impliquent d'autres types de vésicules : les « senescence-associated vacuoles » (SAVs) et les « CV containing vesicles » (CCVs) (**Fig. II.32**).

B.II.2.b.i. Les Senescence-Associated Vacuoles (SAVs)

Les Senescence-Associated Vacuoles (SAVs), sont des petites vacuoles spécifiquement induites lors de la sénescence (0,8 à 1 µm de diamètre) et dont le contenu a un pH plus acide que celui de la vacuole centrale (**Fig. II.34** ; Otegui *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2008; Carrión *et al.*, 2013). Contrairement aux vésicules autophagiques, les SAVs sont des compartiments lytiques avec des activités protéasiques telles que les activités cystéines protéases (Carrión *et al.*, 2013). A titre d'exemple, ce sont dans ces vacuoles que la protéase **SAG12** a été pour la première fois localisée au niveau cellulaire (Otegui *et al.*, 2005). En plus des protéases, Il a été retrouvé au sein des SAVs des protéines chloroplastiques telles que la grande sous-unité de la RuBisCO et la glutamine synthétase. Cependant, aucune protéine des thylakoïdes (telle que la protéine D1, par exemple) n'y a jamais été retrouvée mettant en avant un processus d'exportation sélectif vers ces vésicules (Martínez *et al.*, 2008; Otegui, 2018). Néanmoins, mis à part le fait que leur

formation ne fait pas intervenir de gène d'autophagie (Otegui *et al.*, 2005), il existe, à ce jour, très peu d'information permettant d'appréhender les mécanismes impliqués dans l'apparition de ces vacuoles.

B.II.2.b.ii. Les CV Containing Vesicles (CCVs)

Les CCVs sont des vésicules intervenant dans une voie de dégradation des protéines chloroplastiques indépendante des mécanismes autophagiques. Une protéine transmembranaire, appelée protéine CV, va interagir avec les protéines des thylakoïdes et du stroma puis induire la formation d'un bourgeonnement aboutissant à la création d'une vésicule appelée CCV. Dans cette vésicule, les protéines plastidiales ayant interagit préalablement avec la protéine CV sont chargées et envoyées vers les vacuoles lytiques où elles sont ensuite dégradées. Par ailleurs, Wang et Blumwald (2014) ont montré que la protéine CV nécessaire à la formation des CCVs est fortement accumulée lors de la sénescence foliaire naturelle ou induite par un stress abiotique.

Toutes ces voies vésiculaires aboutissant à la dégradation des protéines plastidiales sont encore relativement peu étudiées et les mécanismes impliqués encore mal élucidés. A titre d'exemple, à ce jour, aucune étude n'a été conduite sur ce sujet chez le colza alors même qu'une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait probablement révéler des leviers d'amélioration sensible de l'ERA.

B.II.3. Les systèmes anti-protéolytiques

Si l'importance des protéases en tant qu'enzymes essentielles à la sénescence ne fait aucun doute, la régulation de leur activité est également un élément important à prendre en compte dans le bon déroulement des processus protéolytiques.

Comme nous venons de le voir, la compartimentation cellulaire et l'expression de facteurs de transcription capables de moduler l'expression des gènes codant ces protéases sont des éléments déterminants pour réguler l'activité protéasique. Par exemple, durant la sénescence foliaire d'*Arabidopsis thaliana***,** il a été démontré que la surexpression du facteur de transcription WRKY53 était un préalable essentiel à l'expression la protéase **SAG12** (Miao *et al.*, 2004)**.** La régulation de l'activité des protéases peut également se faire *via* la synthèse de précurseurs inactifs nécessitant des processus d'auto-activation ou d'activation par d'autres protéases actives. Ces processus permettent d'activer les protéases au moment opportun et ainsi de prévenir une protéolyse spatio-temporelle inappropriée (Diaz-Mendoza *et al.*, 2016). Les CPs et plus particulièrement les PLCPs sont par exemple connues pour être synthétisées avec un pro-peptide qui nécessite d'être clivé pour que la protéase devienne active (Yamada *et al.*, 2001; van der Hoorn *et al.*, 2004; Richau *et al.*, 2012).

Tableau II.3. Classification des inhibiteurs de protéases chez les plantes (d'après Mosolov et Valueva, 2005).

Types d'inhibiteurs de protéases	Protéases inhibées
Soybean Künitz inhibitor	Protéases à sérine, cystéine et aspartate
Baumann-Birk	Protéases à sérine
Potato I inhibitor	Protéases à sérine
Potato II inhibitor	Protéases à sérine
Pumpkin trypsin inhibitors / Squash inhibitors	Protéases à sérine
Trypsin and α-amylase inhibitors from cereal grains	Protéases à sérine
Mustard trypsin inhibitors	Protéases à sérine
Serpins	Protéases à sérine et cystéine
Phytocystatin	Protéases à cystéine

Enfin, l'activité des protéases peut également être négativement régulée par des inhibiteurs de protéases endogènes capables de se fixer au niveau de leur site actif. Ils existent de nombreux inhibiteurs de protéases connus dans le règne végétal (**Tableau II.3** ; Mosolov et Valueva, 2005) et de nombreux travaux utilisant certains de ces inhibiteurs montrent leurs effets sur la régulation de la sénescence et de la protéolyse. A titre d'exemple, l'expression d'inhibiteurs endogènes de protéases à cystéine tels que les cystatines ralentit la progression de la sénescence. Ainsi, la sur-expression d'une cystatine de riz (OC-1) chez le tabac a permis de mettre en évidence un maintien de l'activité photosynthétique dans les feuilles sénescentes des lignées surexprimant l'OC-1 comparées aux feuilles de plantes sauvages (Prins *et al.*, 2008). Chez *Arabidopsis thaliana*, une surexpression de deux cystatines (AtCYSa et AtCYSb) a permis de mettre en lumière l'implication des inhibiteurs de protéases à cystéine de la famille des papaïn-like (PLCPs) dans la tolérance à de nombreux stress tels que les stress salin, hydrique et oxydatif (Zhang *et al.*, 2008).

Par ailleurs, d'autres études réalisées chez *Arabidospis thaliana* ont également permis de montrer que des traitements avec des inhibiteurs synthétiques de protéases à sérine et cystéine provoquaient un ralentissement de la sénescence de différents organes (Coupe *et al.*, 2003; Pak et Doorn, 2005; Carrión *et al.*, 2013). Outre leur intérêt dans les études précédemment citées, ces inhibiteurs sont également des outils de choix pour étudier, *in vitro*, l'activité des différentes classes de protéases (Girondé *et al.*, 2016; Poret *et al.*, 2016), même si leur manque de spécificité peut parfois poser question.

Finalement, *in planta*, l'activité de certaines protéases peut également être modulée par une autre famille d'inhibiteurs dont le rôle durant la sénescence a partiellement été démontré : la famille des **« Water Soluble Chlorophylle binding Protein »** (WSCP ; Yakushiji *et al.*, 1963). Dans le contexte de la sénescence, cette famille d'inhibiteurs est particulièrement intéressante puisqu'en plus d'avoir une activité inhibitrice de certaines classes de protéases (protéases à sérines ou à cystéines), certains membres de cette famille pourraient également avoir une fonction de protection des chlorophylles.

B.II.3.a. Les Water Soluble Chlorophyll binding Proteins

Les WSCPs sont des protéines hydrosolubles identifiées chez une multitude d'espèces dont les Brassicacées tel que le colza (Yakushiji *et al.*, 1963; Takamiya, 1973; Satoh *et al.*, 2001). Basées sur leurs propriétés photochimiques, elles peuvent être partagées en 2 classes : les Chenopodium-type (Classe 1) qui sont dites photo-convertibles car leur spectre d'absorption change avec la lumière blanche (Yakushiji *et al.*, 1963) et les Brassica-type (Classe II) (Murata *et al.*, 1971). La classe II peut elle-même être subdivisée en 2 sous-classes en fonction de leur niveau d'affinité pour la chlorophylle *a et b* :

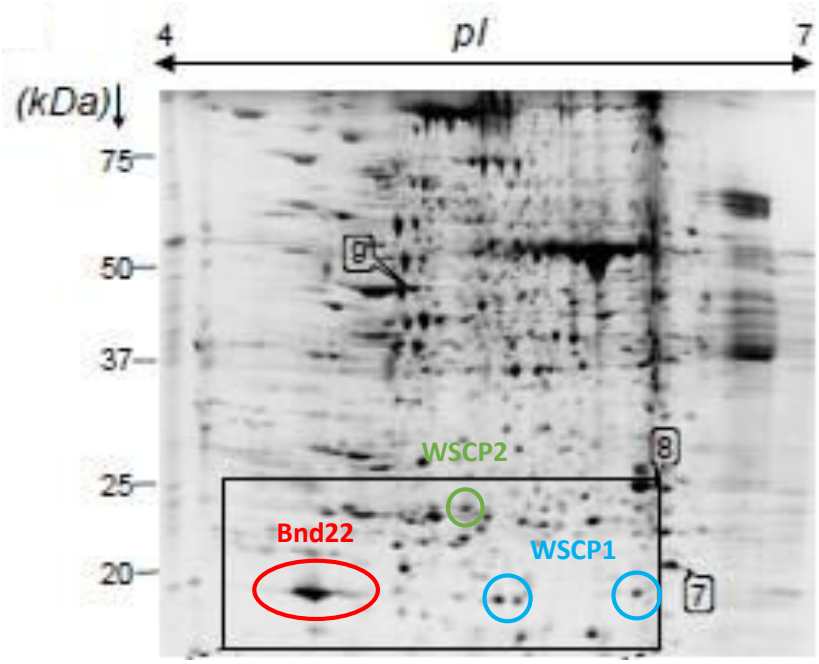


Fig. II.35. Identification sur gel bidimensionnel de 3 « Water Soluble Chlorophyl binding Proteins » (WSCPs : BnD22, WSCP1 et WSCP2), induites par un traitement au Méthyl Jasmonate dans des jeunes feuilles de *Brassica napus* L. (d'après de Desclos *et al*., 2008).

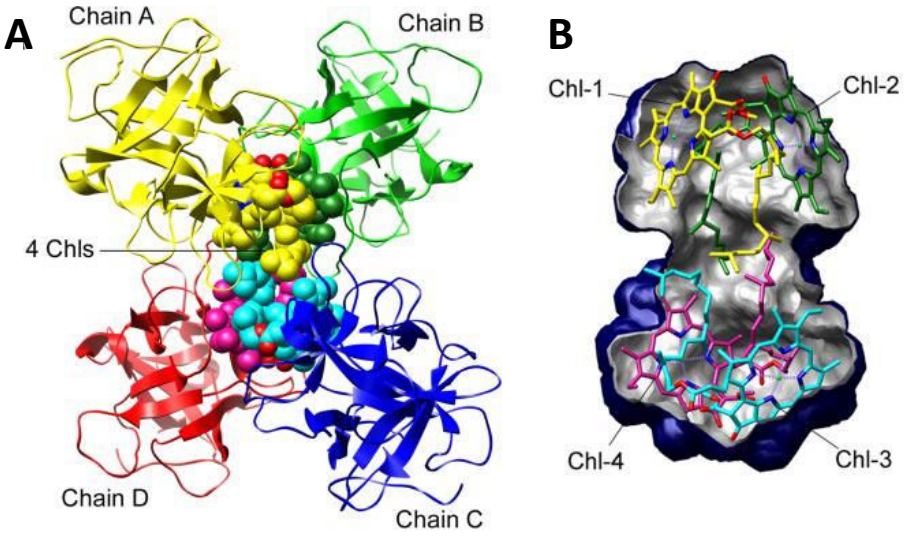


Fig. II.36. Structure tridimensionnelle d'un tétramère de WSCP associé à la chlorophylle chez *Lepidium virginicum*. (A) Les monomères (Chains A, B, C et D) de WSCP sont représentés en jaune, verte, rouge et bleu. Ils forment une cavité dans laquelle 4 molécules de chlorophylle sont fixées (sphères de couleurs). (B) Représentation de la cavité centrale formée par le tétramère de WSCP, contenant les 4 molécules de chlorophylle (d'après Horigome *et al*., 2007).

- La classe IIA appelée aussi Brassica-WSCP possède une plus haute affinité pour la Chl *a* que pour la Chl *b*. La majorité des WSCPs de brassicaées telles que celles du chou-fleur (*Brassica oleracea var Botrity*), du chou de Bruxelles (*Brassica.oleracea var gemmifera*) et du colza (*Brassica napus* L.) se classent dans cette sous-catégorie. Elles sont généralement composées de 4 sous-unités de 20 à 24 kDa (Satoh *et al.*, 2001).
- La classe IIB surnommée Lepidium-WSCP retrouvée chez *lepidium virgincum* est caractérisée par une haute affinité pour la Chl *b* et composée de sous-unité allant de 16 à 22 kDa.

Les WSCPs de classe II, et plus particulièrement de la classe IIA, sont remarquables par leur accumulation lors de stress abiotiques variés (Annamalai et Yanagihara, 1999; Desclos *et al.*, 2008). De par leur accumulation lors d'un stress azoté et leur présence chez le colza, nous focaliserons plus particulièrement sur la classe IIA. Chez le colza, parmi les WSCPs actuellement identifiées, l'une d'elles, appelée BnD22 présente un gradient d'expression antagoniste à celui des protéases (Reviron *et al.*, 1992; Etienne *et al.*, 2007; Desclos *et al.*, 2008). Ainsi, elle est fortement accumulée dans les jeunes feuilles non sénescentes (Downing *et al.*, 1992; Reviron *et al.*, 1992), surtout lorsque les plantes sont soumises à des situations de stress, tels qu'un stress hydrique (Reviron *et al.*, 1992) ou une carence en N ou à l'application d'une phythormone tel qu'un traitement au méthyl jasmonate (Etienne *et al.*, 2007; Desclos *et al.*, 2008). Chez le colza, à la suite d'un traitement au méthyl jasmonate, deux autres WSCPs ont été identifiées dans les jeunes feuilles, WSCP2 et **WSCP1** (**Fig. II.35**)**,** cette dernière présentant des homologies avec une **WSCP1** de *Brassica oleracea* (CauWSCP) (Desclos *et al.*, 2008). Outre la fonction d'inhibiteur de protéases, ces WSCPs ont également une fonction de protection des chlorophylles.

B.II.3.a.i. Les WSCPs et la protection des chlorophylles

Les WSCPs sont impliquées dans la photo-protection des chlorophylles. Ceci a pu être mis en évidence par Schmidt *et al.,* (2003) qui ont été les premiers à démontrer qu'en présence d'une CauWSCP, (i) les chlorophylles étaient moins sensibles à l'exposition à une forte intensité lumineuse, et (ii) la production de ROS (notamment de l'oxygène singulet) lors de la dégradation des chlorophylles était significativement diminuée. La résolution de la structure cristaline de LpWSCP (WSCP de *Lepidium virginicum*) a permis de mettre en évidence 4 acides aminés (proline en position 36, glutamine en position 57 et tryptophanes en positions 90 et 154), dont la position est identique au sein des séquences peptidiques des différentes WSCPs (**Fig. II.36 et Fig. II.37** ; Horigome *et al.*, 2007) et qui permettent la liaison au noyau tetrapyrrolique des chlorophylles. Cette interaction permet la formation d'une barrière physique entre les chlorophylles et les atomes d'oxygène, évitant ainsi la formation de ROS et donc la

```
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                           10         20         30         40         50         60         70
BnD22            MKTFFLVTLL LAAAVCTHGR EQVKDSNGNP VKRGAKYFIQ PAKSNAGGLV PAAINLLPFC PLGITQTLLP
WSCP1            MKTFFLVTLL LAAAVCTHGR EQVKDSNGNP VKRGAKYFIQ PAKSNGGGLF PAAINILPFC PLGITQTLLP
BolC.WSCP1.a     MKTFFLVTLL LAAAVCTHGR EQVKDSNGNP VKRGAKYFIQ PAKSNGGGLF PAAINILPFC PLGITQTLLP

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                           80         90         100        110        120        130        140
BnD22            YQPGLPVSFG YEPVIVGTDY IYTSTTINIE FESDIWPVCN ELSKLWAVDV SSSAAKEPAI IIGGESTAPN
WSCP1            YQPGLPVSFG YEPVIVGTDY IYTSTTINIE FRSEIWPGCN ELSKLWAVDV SSTAAKEPAI IIGGERTAPN
BolC.WSCP1.a     YQPGLPVSFG YEPVIVGTDY IYTSTTINIE FRSEIWPGCN ELSKLWAVDV SSTAAKEPAI IIGGERTAPN

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                          150        160        170        180        190        200        210
BnD22            SLFKIEEATE ANTYKLTTSY GTVGTIPGPW LSAPQLIVTN DESKTLFVKF VKVDDAATKA TTSTSRVEKL
WSCP1            SLFKIEEATG AHTYKLTTSS GTVGTIPGPW LGAPQLIATN DDAKTLFVKF VKVDDDATKA TTSTSRVEKL
BolC.WSCP1.a     SLFKIEEATG AHTYKLTTSS GTVGTIPGPW LGAPQLIATN DDAKTLFVKF VKVDDDATKA TTSTSRVEKL

                 ....|...

BnD22            GLKMFPFY
WSCP1            GLRMFPFY
BolC.WSCP1.a     GLRMFPFY
```

Fig. II.37. Alignement des séquences d'acides aminés de BnD22, de WSCP1 de *Brassica napus* L. et de WSCP1 de *Brassica oleracea*. Les rectangles rouge et noir correspondent respectivement au domaine Kunitz-type des inhibiteurs de protéases et à la zone conservée en C-terminale des WSCPs. Les 4 acides aminés entourés en vert permettent la fixation à la chlorophylle. Les astérisques bleus indiquent les sites de clivage des peptides aux extrémités N- et C- terminales.

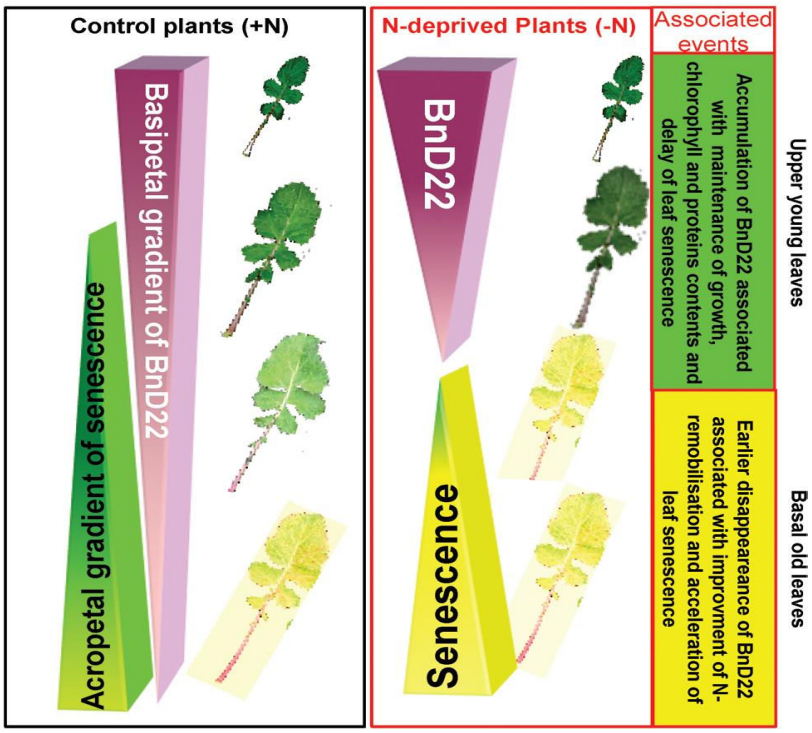


Fig. II.38. Représentation schématique de la progression acropète de la sénescence et du gradient basipète de l'accumulation de BnD22 le long de l'axe de la plante de colza soumise ou non à une limitation en N. Les évènements physiologiques associés au processus de sénescence ainsi que la présence ou non de BnD22 dans les jeunes et dans les vieilles feuilles de plantes cultivées sous limitation azotée, sont présentés respectivement dans les cadres vert et jaune (Avice et Etienne, 2014).

dégradation des chlorophylles (**Fig. II.36**). Enfin Damaraju et collaborateurs (2011) ont confirmé cette fonction de protection des chlorophylles des WSCPs en montrant qu'une surexpression chez le tabac d'une WSCP de choux fleur (CauWSCP) s'accompagnait d'une meilleure tolérance au stress lumineux se traduisant notamment par une diminution de la production de ROS associée à un maintien des teneurs en chlorophylles.

B.II.3.a.ii. Les WSCPs, des inhibiteurs de protéases

En plus de leur fonction de protection des chlorophylles, certaines WSCPs ont également une fonction inhibitrice de protéases (protéases à sérine ou cystéine). Ces WSCPs constituent une petite sous-famille appelée « Künitz protease inhibitor » caractérisée par la présence d'un motif signature au sein de leur séquence peptidique : ([LIVM]-x-D-x-[EDNTY]-[DG]-[RKHDENQ]-x-[LIVM]-x(5)-Y-x-[LIVM]) (**Fig. II.37** ; (Satoh *et al.*, 2001; Rustgi *et al.*, 2017*b*).

Pour certaines WSCPs, leur fonction d'inhibiteur de protéases a été démontrée *in planta*. A titre d'exemple, chez le colza, l'activité inhibitrice de protéases d'une WSCP de type Künitz protease inhibitor (appelée BnD22), a été mise en évidence à des pH compris entre 5 et 8 dans des feuilles non sénescentes (Ilami *et al.*, 1997). De plus, Etienne et collaborateurs (2007) ont montré chez des plantes de colza carencées en N une accélération de la sénescence des vieilles feuilles et un retard d'entrée en sénescence des feuilles plus jeunes comparées aux mêmes feuilles de plantes correctement alimentées en N. Dans cette même étude, ces auteurs ont montré que l'entrée prématurée en sénescence des vieilles feuilles était corrélée à une disparition rapide de la protéine BnD22 alors qu'au contraire le retard d'initiation de sénescence dans les jeunes feuilles était corrélé à une accumulation de cette même protéine (**Fig. II.38**). Ainsi ces auteurs suggèrent que chez le colza soumis à une privation en N, la protéine BnD22 participerait à la fois à l'inhibition des protéases et à la protection des chlorophylles au sein de jeunes feuilles afin de maintenir le plus longtemps possible leur intégrité physiologique dans l'attente de condition de disponibilité en N plus favorable à la croissance. Par ailleurs, chez *Arabidopsis thaliana,* des études ont également mis en évidence que des WSCPs étaient capables d'inhiber l'activité de RD21, une des protéases à cystéine les plus induites au cours de la sénescence foliaire (Boex-Fontvieille *et al.*, 2015; Pružinská *et al.*, 2017). De manière intéressante et surprenante, certaines études ont montré que cette inhibition de protéases par les WSCPs était réversible par la lumière. Ce processus a été mis en évidence par le fait que des graines germées et étiolées montraient une interaction entre la WSCP et RD21 qui disparaissait après un flash lumineux. (Boex-Fontvieille *et al.*, 2015; Rustgi *et al.*, 2017*a*).

Toutes ces études sur les inhibiteurs de protéases montrent l'importance de ceux-ci dans la tolérance aux stress abiotiques mais également dans la régulation des activités protéolytiques associées à la sénescence. Ces différents inhibiteurs de protéases, et plus particulièrement les WSCPs, pourraient également réduire l'asynchronisme existant entre la période de vidage de ces organes sources et la période de remplissage des graines et ainsi améliorer la remobilisation de l'N.

C. Problématique et objectifs de recherche

Comme nous venons de le voir au travers de cette synthèse bibliographique, le colza est une plante présentant une mauvaise efficience d'usage de l'N (EUA) principalement due à une mauvaise efficience de remobilisation de cet élément (ERA), notamment au cours du stade végétatif. Outre les conséquences négatives sur le rendement, les pertes d'N liées à cette mauvaise remobilisation conduisent à des problèmes environnementaux liés notamment aux phénomènes de volatilisation et de lixiviation de l'N. Il est généralement admis que la faible EUA des variétés de colza actuellement cultivées est la conséquence d'une stratégie de sélection variétale conduite jadis, sans prise en compte du ratio rendement/fertilisant. Aujourd'hui, dans un contexte d'une agriculture plus raisonnée, la sélection de nouvelles variétés de colza présentant un maintien, voire une amélioration des rendements, en réponse à de faibles apports d'intrants azotés constitue un défi majeur tant sur le plan environnemental qu'économique. Le programme Investissement-Avenir RAPSODYN[7], coordonné par Nathalie NESI (DR à l'IGEPP, INRA de Rennes) et auquel est adossé mon travail de thèse, s'inscrit totalement dans cette problématique puisque **l'objectif principal de ce programme vise à identifier de nouvelles variétés de colza à forte EUA en réponse à de faibles apports de fertilisants azotés.**

Au cours de ce travail de thèse, nous avons focalisé nos études sur l'ERA, un levier d'amélioration de l'EUA particulièrement intéressant puisqu'il est suggéré depuis de nombreuses années qu'une meilleure remobilisation des stocks endogènes d'N pourrait conduire à une amélioration du bilan agro-environnemental de la culture du colza. Dans ce contexte, de nombreuses études montrent qu'une optimisation de l'ERA nécessiterait notamment une amélioration de la protéolyse lors de la sénescence foliaire. A titre d'exemple, des études récentes ont permis de montrer que des génotypes de colza particulièrement efficaces dans la dégradation des protéines solubles présentaient aussi une forte efficience de remobilisation de l'N (Girondé *et al.*, 2015*b*). Ainsi, les protéases à sérine, à aspartate et surtout les protéases à cystéine, semblent jouer un rôle central dans ce processus de protéolyse associé à la sénescence foliaire. De nombreux travaux suggèrent que ces protéases pourraient être des déterminants moléculaires majeurs dans le but d'obtenir, *in fine*, une remobilisation de l'N plus efficiente (Kato *et al.*, 2004; Desclos *et al.*, 2009; Poret *et al.*, 2016). Parmi les protéases les plus induites au cours de la sénescence, la protéase à cystéine **SAG12** pourrait être un acteur majeur de la dégradation des protéines

[7] ANR-11-BTBR-004 RAPSODYN – Investments for the future : Optimisation of the RAPeSeed Oil content anD Yield under low Nitrogen input

solubles. Toutefois, si la forte induction de cette protéase dans les tissus sénescents de nombreuses espèces végétales fait consensus, son véritable rôle au cours de la sénescence est, à ce jour, très controversé puisque par exemple, certains auteurs lui attribue un rôle mineur dans la progression visuel de la sénescence (Otegui *et al.*, 2005), voire un rôle de régulateur négatif de la sénescence (Singh *et al.*, 2013, 2016).

Dans ce contexte, **le premier objectif de ces travaux de thèse a consisté à réaliser une étude fonctionnelle de la protéase SAG12 visant notamment à préciser son rôle dans les processus de remobilisation et d'allocation de l'N durant la sénescence.**

Pour répondre à cet objectif, la méthodologie a consisté à éteindre le gène *SAG12*. En l'absence de lignée de colza knock-out (KO) pour les gènes *SAG12* et de méthode de transformations simples de cette espèce, il a été décidé de réaliser ces études sur une lignée KO *SAG12* (*sag12*) de l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*. Pour ce faire, différentes études comparatives (biomasses, sénescence foliaire, rendements, activités protéases, teneurs en N…) par rapport au type sauvage (Col) ont été conduites dans le but de réaliser un phénotypage complet aux stades végétatif et reproducteur des lignées *sag12* cultivées en conditions limitantes ou non en N (Article 1). Ces travaux, constituant le Chapitre IV-A de la partie « Résultats », ont été valorisés par une publication dans le journal « Plant and Cell Physiology » :

Chapitre IV-A : SAG12, a major cysteine protease involved in nitrogen allocation during senescence for seed production in *Arabidopsis thaliana*. Maxence James, Marine Poret, Céline Masclaux-Daubresse, Anne Marmagne, Laurent Coquet, Thierry Jouenne, Philippe Chan, Jacques Trouverie, Philippe Etienne. **Plant and Cell Physiology**
(doi.org/10.1093/pcp/pcy125).

Au vue des résultats obtenus, des analyses moléculaires combinées à l'utilisation de marquage ^{15}N ont été conduites dans le but de mieux appréhender l'importance de la protéase SAG12 dans la gestion de l'N au cours de la période clé que constitue le remplissage des graines de plantes cultivées en conditions limitantes en N. Les résultats obtenus au cours de ces travaux ont permis la rédaction d'un article actuellement soumis au journal « Frontiers in Plant Science » et qui constitue le Chapitre IV-B de la partie « Résultats » :

Chapitre IV-B : A new role for SAG12 cysteine protease in roots of *Arabidopsis thaliana*. Maxence James, Céline Masclaux-Daubresse, Anne Marmagne, Marianne Azzopardi, Philippe Etienne, Jacques Trouverie. Soumis à **Frontiers in Plant Science**.

La compréhension de la fonction de la protéase SAG12 au sein de la plante nous a amené à nous intéresser de manière plus générale aux rôles des protéases à cystéine chez le colza.

Pour cela, nous avons tiré parti d'une culture conduite à l'Institut Jean-Pierre Bourgin de l'INRA de Versailles (IJPB) dont l'objectif était de multiplier les graines d'une lignée de colza de printemps (*Brassica napus* L. cv. *Drakkar*) sur-exprimant, sous le contrôle d'un promoteur 35S, un inhibiteur des CPs (une cystatine de riz : OCI). Une étude préliminaire de son développement essentiellement focalisée sur la production de biomasse lors de la maturation des graines a été entreprise. Ces résultats préliminaires sont présentés dans le chapitre IV-C :

Chapitre IV-C : Etude du rôle des protéases à cystéine dans l'élaboration du rendement chez le colza (*Brassica napus* L.).

Un second levier d'amélioration de l'ERA consiste à prolonger la durée de vie des feuilles en retardant la sénescence foliaire (effet «stay-green») afin de réduire l'asynchronisme existant entre la période de vidage de ces organes sources et la période de remplissage des graines (Kusaba *et al.*, 2013). *In planta,* des inhibiteurs naturels de protéases, dont certains seraient capables de moduler la progression de la sénescence, constituent des candidats particulièrement intéressants dans l'objectif d'obtenir des lignées dites «stay-green». Parmi ces inhibiteurs, **les Water Soluble Chlorophyll binding Proteins (WSCPs)** semblent particulièrement pertinents, puisque certaines associent à leur fonction de protection des chlorophylles, une fonction inhibitrice de protéases. Cependant, les études focalisées sur le rôle des inhibiteurs de type WSCPs en lien avec la sénescence sont peu nombreuses, même si l'une d'entre elles, réalisée au laboratoire, a cependant permis d'identifier au moins 2 WSCPs (BnD22 et WSCP1) chez le colza (Etienne *et al*., 2007 ; Desclos *et al*., 2008). **Le second objectif de cette thèse a donc consisté à réaliser une étude fonctionnelle de la protéine WSCP1, afin notamment de vérifier sa possible implication dans la régulation de la sénescence foliaire.**

Afin de répondre à cet objectif, des lignées d'*Arabidopsis thaliana* caractérisées par une sénescence foliaire précoce (RIL232 ; Loudet *et al.*, 2002) ont été utilisées comme fond génétique pour obtenir des lignées sur-exprimant la protéine WSCP1 sous contrôle du promoteur SAG12

(*pSAG12::WSCP1*). Des expérimentations ont été conduites sur ces lignées afin de vérifier si la surexpression de cette WSCP1 était susceptible d'atténuer le phénotype hyper-sénescent des RIL232. Les résultats issus de ces travaux sont présentés dans le chapitre IV-D de la partie « Résultat » sous la forme d'un troisième article en cours de rédaction :

Chapitre IV-D : Overexpression of a Brassica napus L. Water Soluble Chlorophyll binding Protein (WSCP1) to delay dark-induced leaf senescence in Arabidopsis thaliana. Maxence James, Alexandra Girondé, Anne Marmagne, Didier Goux, Jacques Trouverie, Philippe Etienne.

CHAPITRE III

MATÉRIELS ET MÉTHODES

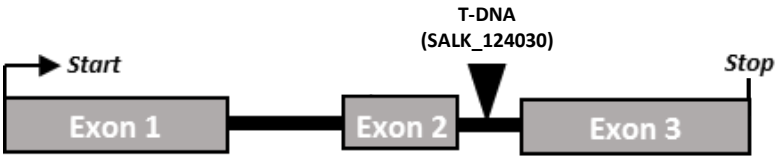


Fig. III.1. Représentation schématique du KO-*sag12* (SALK_124030) utilisé dans notre étude.

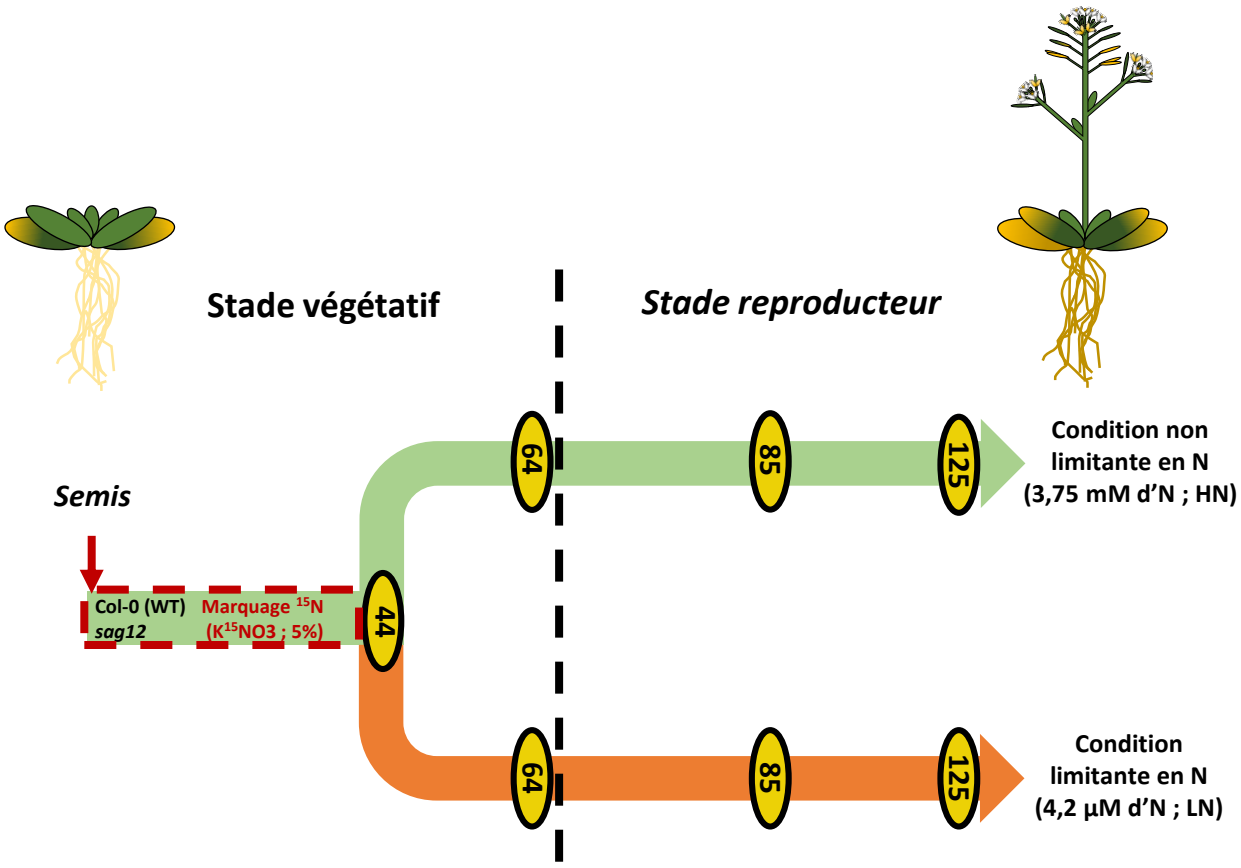


Fig. III.2. Dispositif expérimental utilisé pour l'étude du rôle fonctionnel de la protéase SAG12 chez des plantes d'*Arabidopsis thaliana* Col et *sag12* cultivées en condition limitante ou non en azote. Les plantes ont été cultivées jusqu'au stade graines matures (125 jours après semis). Après 44 jours de culture, un traitement limitant en azote (4,2 µM d'N; LN) a été appliqué à une partie des plantes afin d'exacerber la sénescence puis après 64 jours de culture, les plantes ont été placées en jours longs afin d'initier la montaison. Les ellipses jaunes correspondent aux jours de récolte exprimés en jour après semis. Un marquage ^{15}N d'une durée de 44 jours à été réalisé dès le début de la culture afin de suivre la remobilisation de l'N.

A. Conditions de culture et dispositifs expérimentaux

A.I. Première expérimentation : Etude fonctionnelle de la protéase SAG12

A.I.1. Conditions de cultures

Afin d'étudier le rôle fonctionnel de la protéase SAG12, il a été décidé de travailler sur *Arabidopisis thaliana* pour la disponibilité, chez cette espèce, de lignées knock-out (KO) pour le gène codant cette protéine. La lignée knock-out choisie (*sag12)* est la même que celle utilisée dans l'étude de Pružinská *et al.*, (2017) et possède une insertion de T-DNA dans l'intron du gène SAG12 (SALK_124030 ; **Fig. III.1**). Le fond génétique utilisé pour cette lignée *sag12* étant Columbia (Col), ce génotype a également été utilisé comme contrôle.

Les graines des deux génotypes, préalablement stratifiées durant 48 heures dans 0,1 % d'agar (Select agar, Sigma, L'Isle d'Abeau Chesnes, France) à 4 °C et à l'obscurité ont été semées sur le haut d'un tube eppendorf (0,5 mL) rempli avec de l'agar 0,8 % et placées dans des boites contenant 580 ml d'eau osmosée. Le fond des tubes a été préalablement percé afin d'assurer le contact de l'agar avec l'eau osmosée et les boites ont été recouvertes d'un plexiglas afin de maintenir un niveau d'humidité élevé durant la germination et l'apparition des premières feuilles. Lorsque la racine émerge du tube et que les 2 premières vraies feuilles sont apparues, les tubes contenant les plantules ont été transvasés sur des bacs contenant 10 L d'une solution Hoagland ¼ (3,75 mM d'N ; 1,25 mM $Ca(NO_3)_2.4H_2O$, 1,25 mM KNO_3, 0,5 mM $MgSO_4$, 0,25 mM KH_2PO_4, 0,2 mM $EDTA.NaFe.3H_2O$, 14 µM H_3BO_3, 5 µM $MnSO_4$, 3 µM $ZnSO_4$, 0,7 µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 0,7 µM $CuSO_4$, 0,1 µM $CoCl_2$), constamment oxygénée et renouvelée toutes les semaines. Afin de suivre précisément la remobilisation de l'azote (N) au sein de la plante, la solution Hoagland ¼ apportée a par ailleurs été enrichie avec 5 % de ^{15}N durant les 44 premiers jours en utilisant comme unique source d'azote du KNO_3. A l'issue de ces 44 jours, les plantes marquées de façon homogène ont été transférées dans des solutions non enrichies en ^{15}N et présentant deux niveaux d'N contrastés : une condition non limitante en azote (HN ; 3,75 mM d'N) et une condition limitante en azote (LN ; 4,2 µM d'N ; **Fig. III.2 & tableau III.1**).

Le rayonnement photosynthétiquement actif (PAR, « Photosynthetically Active Radiation ») perçu par les plantes était de 110 mmol m^{-2} s^{-1} avec une température de 21 °C le jour et 18 °C la nuit. Durant les 64 premiers jours, les plantes ont été cultivées avec une photopériode de 8 heures (jour)/16 heures (nuit).

Tableau III.1. **Composition en sels des différentes solutions nutritives utilisées lors des cultures.**

Sels	Hoagland ¼ (3,75 mM N)	Hoagland ¼ (4,2 µM N)	Hoagland ¼ marquée au ^{15}N (3,75 mM N)
$Ca(NO_3)_2, 4H_2O$	1,25 mM	0 mM	0 mM
KNO_3	1,25 mM	0 mM	3,75 mM $K^{15}NO_3$
KH_2PO_4	0,25 mM		
$MgSO_4$	0,5 mM		
$EDTA, 2NaFe, 3H_2O$	0,2 mM		
$CaCl_2, 2H_2O$	/	1,25 mM	
KCL	/	1,25 mM	
Oligoéléments			
H_3BO_3	14 µM		
$MnSO_4, H_2O$	5 µM		
$ZnSO_4, 7H_2O$	3 µM		
$CuSO_4, 5H_2O$	0,7 µM		
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	0,7 µM	/	
$CoCl_2$	0,1 µM		
$Na_2MoO_4, 2H_2O$	/	0,1 µM	

La montaison, correspondant au stade reproducteur, a été induite par le passage en jours longs, soit une photopériode de 16 heures de jour et 8 heures de nuit.

A.I.2. Organisation des récoltes

Les plantes ont été récoltées à 44 et 64 jours après semis (DAS), *i.e.* durant le stade végétatif, et à 85 et 125 DAS, *i.e.* durant le stade reproducteur (**Fig. III.2**). Selon le stade de développement, le nombre de plantes récoltées pour constituer une répétition biologique a été adapté afin d'assurer suffisamment de biomasse et constituer 3 répétitions biologiques pour les stades 44 et 64 DAS (stades végétatifs correspondant aux stades rosette 18, 56 (HN) et 48 (LN) feuilles respectivement) et 4 répétitions biologiques pour les stades 85 et 125 DAS (stades reproducteurs correspondant à la montaison avec plus de 50 % des siliques apparues et à l'obtention de graines matures, respectivement). Les paramètres mesurés sur ces plantes ont été les suivants :

- A **44 DAS**, la biomasse fraîche et sèche des feuilles et racines ainsi que les teneurs en azote et en ^{15}N.
- A **64 DAS**, la biomasse fraîche et sèche des feuilles et racines. Une photo de l'ensemble des feuilles a été prise afin de déterminer, *a posteriori*, par analyse d'images (cf paragraphe B.I.1) les surfaces foliaires totales, vertes et sénescentes.
- A **85 DAS**, La biomasse sèche et fraîche des racines et des siliques. La longueur moyenne et le nombre de siliques a été évalué pour chaque plante récoltée.
- A **125 DAS**, la biomasse sèche (racines, feuilles, tiges, péricarpes, graines) et les teneurs en azote et en ^{15}N pour tous les organes. Le poids de 1000 graines ainsi que la vigueur germinative des graines ont ensuite été évalués.

A.II. Deuxième expérimentation : Rôle d'une WSCP exprimée lors de la sénescence

A.II.1. Conditions de culture

Pour étudier l'effet de l'expression d'une WSCP de colza lors de la sénescence induite chez *Arabidopsis thaliana,* deux lignées d'Arabidopsis transformées (p*SAG12*::*WSCP1* n°5 et 6) ont été mises au point. Ces deux lignées possèdent le gène *WSCP1* de *Brassica oleracea* (AB012699) trouvé chez *Brassica napus* L. sous contrôle du promoteur *SAG12* (U37336) (**Fig. III.3A**) introduit à l'aide du plasmide pMAZ01

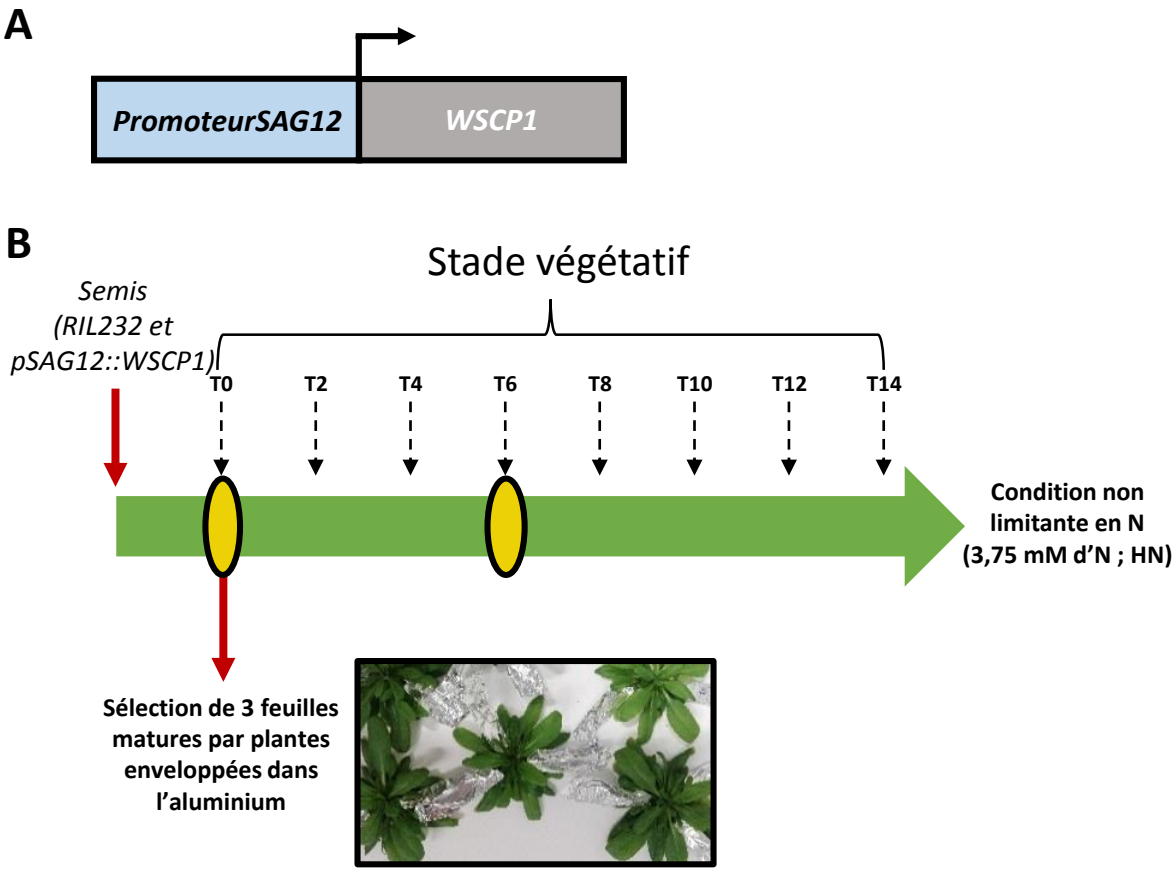


Fig. III.3. Représentation schématique de la construction génique du gène WSCP1 sous contrôle du *promoteurSAG12* utilisée pour générer des lignées d'*Arabidopsis thaliana* surexprimant WSCP1 (A) et dispositif expérimental utilisé pour l'étude de WSCP1 lors de la sénescence foliaire induite par l'obscurité (B). Les lignées *RIL232* et *pSAG12::WSCP1* ont été cultivées en condition non limitante en azote (3,75 mM d'N ; HN). La lignée RIL232 correspond à une lignée naturellement hyper-sénescente (Diaz *et al.*, 2005) et qui a servi de fond génétique pour obtenir les lignées *pSAG12*::*WSCP1*. Après de 60 jours de culture, sélection de 3 feuilles matures par plante enveloppées dans du papier aluminium afin de les mettre à l'obscurité et d'induire la sénescence. A partir de ce moment, une cinétique de mesures SPAD a été réalisée (flèches en pointillé). Les ellipses jaunes indiquent les temps de récolte des feuilles.

(Gan et Amasino, 1995) dans la lignée sauvage RIL232 caractérisée par une sénescence précoce (Diaz *et al.*, 2005).

Le semi a été réalisé comme décrit précédemment et les plantes ont été cultivées en hydroponie en condition non limitante en N avec une solution Hoagland ¼ (3,75 mM d'N ; **tableau III.1**). 60 jours après semis, 3 feuilles matures ont été sélectionnées sur chaque plante. Ces feuilles ont ensuite été enveloppées dans du papier aluminium pour générer un stress « obscurité » permettant d'induire la sénescence. A partir de ce moment, une cinétique de mesure des teneurs en chlorophylle des feuilles matures avec des pas de temps de 2 jours a été réalisée à l'aide de l'appareil SPAD (SPAD modèle 502, Minolta, Japon).

A.II.2. Organisation des récoltes

Deux points de récoltes ont été réalisés (**Fig. III.3B**) :

- T0 : Début de la cinétique.
- T6 : Un point de récolte où une différence des teneurs en chlorophylle entre les lignées a été observée.

A chaque point de récolte, un dosage protéique par la méthode de Bradford (1976), une détection d'activité des protéases à sérine et de la présence de WSCP1 par western blot (en utilisant un anticorps anti WSCP1 synthétisé pour les besoins de cette étude ; Eurogentec®) a été réalisé. En parallèle, des feuilles sénescentes ont été récoltées afin de réaliser l'immunolocalisation de la protéine WSCP1 en utilisant des méthodes de microscopie photonique.

A.III. Construction et sélection des lignées transgéniques

Le promoteur SAG12 (*pSAG12*), correspondant à la séquence de paires de bases 1-2180 trouvée dans la banque de gènes sous le numéro d'accès U37336, a été cloné à partir du plasmide pSG499 (Gan et Amasino, 1995) gracieusement fourni par Pr. R. Amasino (University of Wisconsin-Madison, USA) puis inséré dans le vecteur pMDC32 entre les sites des enzymes de restriction PmeI et AscI, à la place du promoteur 35S, donnant ainsi le plasmide pMAZ01. Le plasmide pMAZ01 a été entièrement séquencé afin de vérifier l'absence de toute modification, en particulier dans la séquence *pSAG12*. La séquence codante pleine longueur de UIDA (gène codant la *β-glucuronidase* (GUS); numéro d'accession AJ298139) ou *WSCP1* a ensuite été clonée successivement dans le vecteur pENTRTM (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), puis dans le vecteur pMAZ01 (contenant le gène de résistance à l'hygromycine ; **Fig. III.4**) par recombinaison Gateway donnant lieu au vecteur pMAZ02 contenant la fusion *pSAG12*::*UIDA ou pSAG12*::*WSCP1*. La

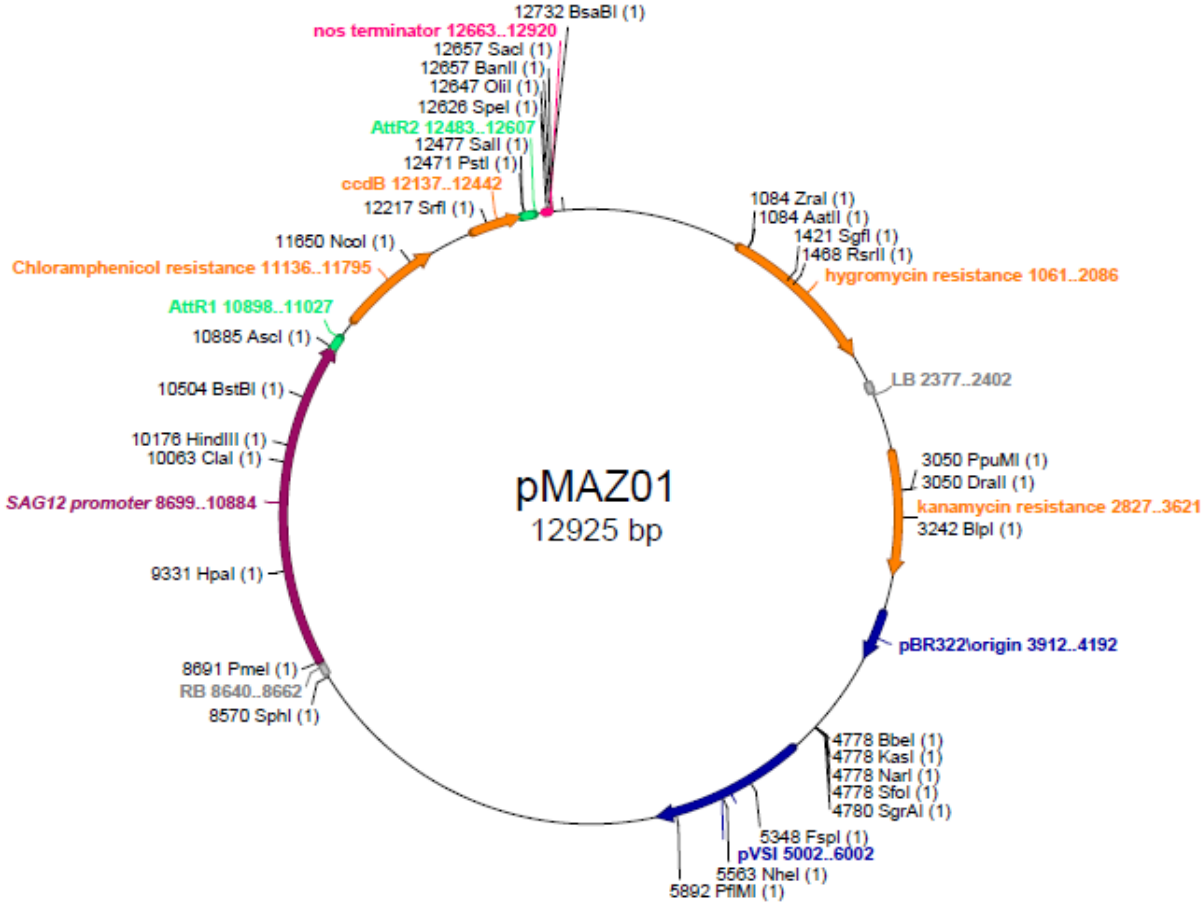


Fig. III.4. Schéma du vecteur pMAZ01 contenant le promoteur *SAG12* ainsi que différents gènes de résistance (chloramphenicol, hygromycine et kanamycine). Les différents sites de restrictions ainsi que leur localisation sont indiqués sur le vecteur

séquence GUS ou WSCP1 dans ce vecteur a été vérifiée par séquençage. Des plantes transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* porteuses du promoteur SAG12 fusionné au gène rapporteur UIDA ou WSCP1 ont été obtenues par trempage floral (Clough et Bent, 1998) et 8 lignées homozygotes de plusieurs transformants primaires ont été sélectionnées sur la base de leur résistance à l'hygromycine et de leur taux de ségrégation par insertion unique (lignées *pSAG12*::*UIDA ou pSAG12::WSCP1*).

B. Protocoles expérimentaux

B.I. Etudes de l'état physiologique de la plante

B.I.1. Mesure de la surface foliaire

Les surfaces foliaires ont été mesurées après avoir détaché et étalé toutes les feuilles de la rosette sur un tissu noir afin de les prendre en photo (Canon Powershot G10, Canon, Japon, 14.8 Mpx, JPEG). Les photos ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ (Schneider *et al.*, 2012) et d'une macro spécialement développée pour déterminer les surfaces totales et vertes (considérées comme non sénescentes). Cette macro permet la détection de couleurs en se basant sur les différentes composantes du système HUE (Hue-Saturation-Lightness). Les surfaces foliaires sénescentes ont été obtenues par différence entre surface totale et la surface verte.

B.I.2. Estimation des teneurs en chlorophylle

La pince SPAD (SPAD modèle 502, Minolta, Japon) permet d'obtenir un indice qui est corrélé à la teneur en chlorophylle (Uddling *et al.*, 2007). Ainsi, les teneurs foliaires en chlorophylle ont été estimées grâce aux mesures réalisées à l'aide de la pince SPAD. Pour chaque feuille et chaque temps, la valeur SPAD obtenue est une moyenne de 6 mesures uniformément réparties sur la feuille.

B.I.3. Analyse de la vigueur germinative

La capacité germinative des graines matures issues des plantes de génotypes *sag12* et Col cultivées en condition limitante en azote a été évaluée. Pour chaque génotype, cinquante graines par répétition biologique (n=4) ont d'abord été stratifiées pendant 48 heures dans 0,1 % d'agar (Select agar, Sigma, L'Isle d'Abeau Chesnes, France) à 4 °C et à l'obscurité puis, semées sur trois feuilles de papier Wattman imbibées d'eau ultra-pure dans des boîtes de Pétri (12 x 12 cm). Les boîtes ont été fermées à l'aide d'un sparadrap microporeux (Leukopore®) et placées à l'obscurité en chambre de culture à 20 °C et 70 % d'humidité relative. A intervalle régulier, les graines pour lesquelles la radicule apparaissait hors du tégument sont

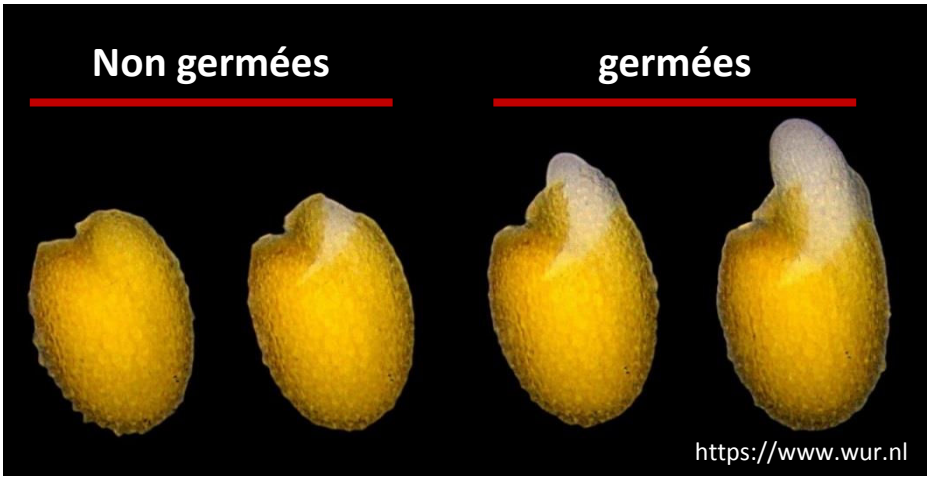


Fig. III.5. Exemples de graines d'*Arabidopsis thaliana* considérées comme germées ou non lors du test de germination.

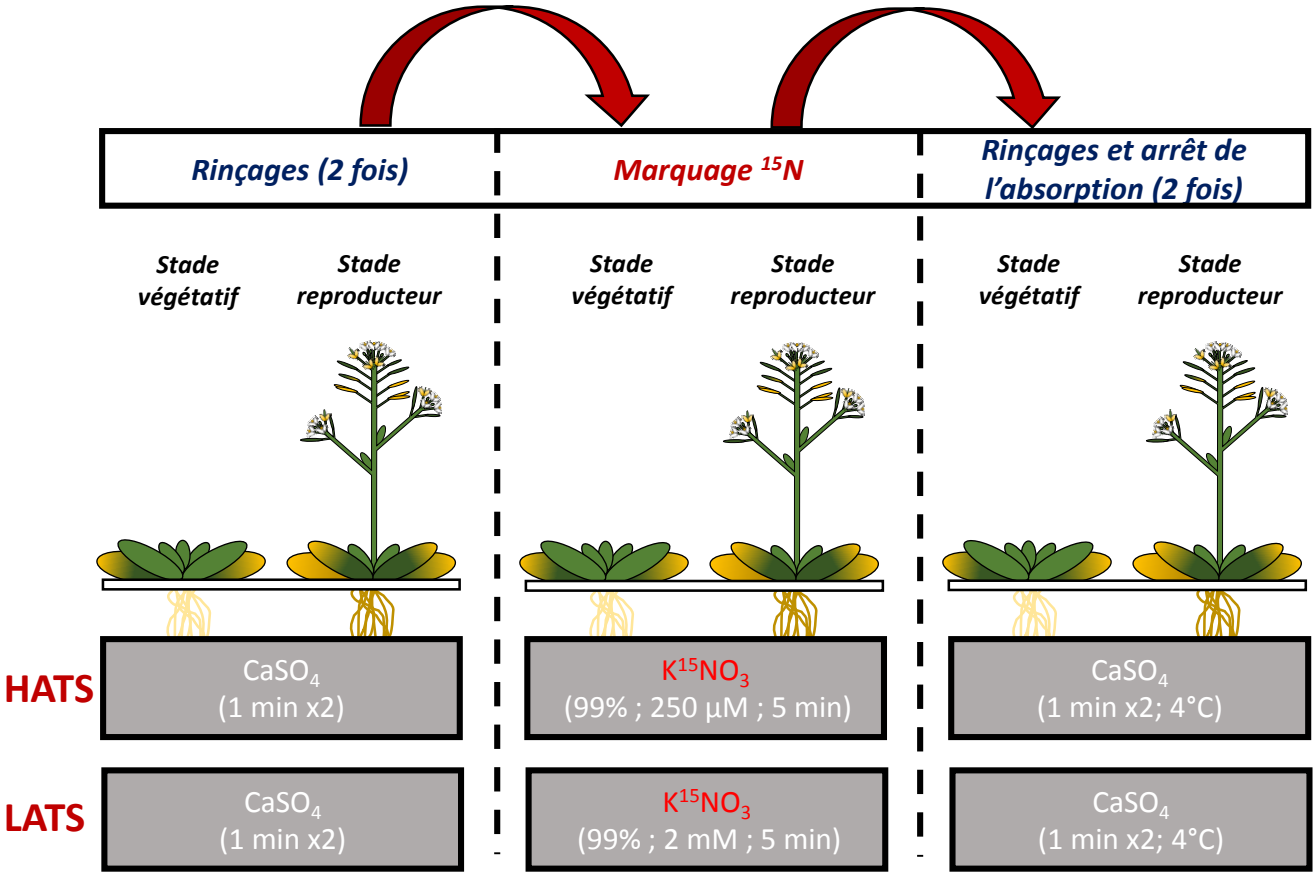


Fig. III.6. Méthode utilisée pour mesurer la capacité d'absorption de l'azote des lignées d'*Arabidopsis thaliana* Col et *sag12* aux stades végétatif et reproducteur. HATS : High Affinity Transport Systems, LATS : Low Affinity Transport Systems.

considérées comme germées (**Fig. III.5**). Une mesure du taux de germination a été réalisée toutes les 12 heures puis toutes les 3 heures lorsque les premières graines ont commencé à germer.

B.I.4. Analyse du développement des plantules

Le développement des plantules issues des graines *sag12* et Col obtenues de plantes mères cultivées en condition limitante en N a été déterminé par une mesure de biomasse. Dix graines matures de 4 répétitions biologiques ont été semées après avoir été stratifiées pendant 48 heures dans 0,1 % agar (Select agar, Sigma, L'Isle d'Abeau Chesnes, France) à 4°C et à l'obscurité. Ces graines ont été semées à la surface de tubes dont le fond a été préalablement percé afin d'être en contact avec l'eau, le tout recouvert d'un plexiglas permettant de maintenir un niveau d'humidité élevé propice à la germination. Les graines semées sur les tubes contenant 0,7 % d'agar (w/v) ont été cultivées pendant 10 jours sur l'eau ultra-pure sous 110 mmol m^{-2} s^{-1} de radiations photosynthétiquement actives, une photopériode de 16 heures (jour)/8 heures (nuit) et une température de 21°C jour/18°C nuit. La masse fraîche des plantules a été déterminée 10 jours après semis (DAS) à l'aide d'une microbalance (MSA 6.6, Sartorius, Göttingen, Deutschland).

B.I.5. Etude de la capacité maximale d'absorption d'N racinaire des deux génotypes

Afin de mesurer la capacité d'absorption racinaire d'N, les génotypes *sag12* et Col ont été cultivés en hydroponie au stade végétatif (64 DAS) et reproducteur (85 DAS) en condition HN (cf paragraphe A.I.1). Les racines des plantes sorties de leur milieu hydroponique ont été rincées deux fois pendant 1 minute dans une solution de $CaSO_4$ (1 mM ; Sulfate de calcium), légèrement séchées avant d'être plongées durant 5 minutes dans une solution de $K^{15}NO_3$ (nitrate de potassium marqué à 99 % au ^{15}N) à 250 µM afin de mesurer les capacités d'absorption N par le système HATS (High Affinity Transport Systems) et à 2 mM pour mesurer les capacités d'absorption d'N par le système LATS (Low Affinity Transport Systems) (**Fig. III.6**). L'absorption racinaire d'N a ensuite été stoppée en trempant 2 fois les racines dans une solution de $CaSO_4$ (1 mM) à 4 °C pendant 1 minute puis des aliquotes frais (-80 °C) et secs (étuve) ont été réalisées pour des analyses ultérieures telles que le dosage du ^{15}N permettant de calculer une capacité d'absorption d'N par plante en ug ^{15}N. mg^{-1} MS de racines.h^{-1}.

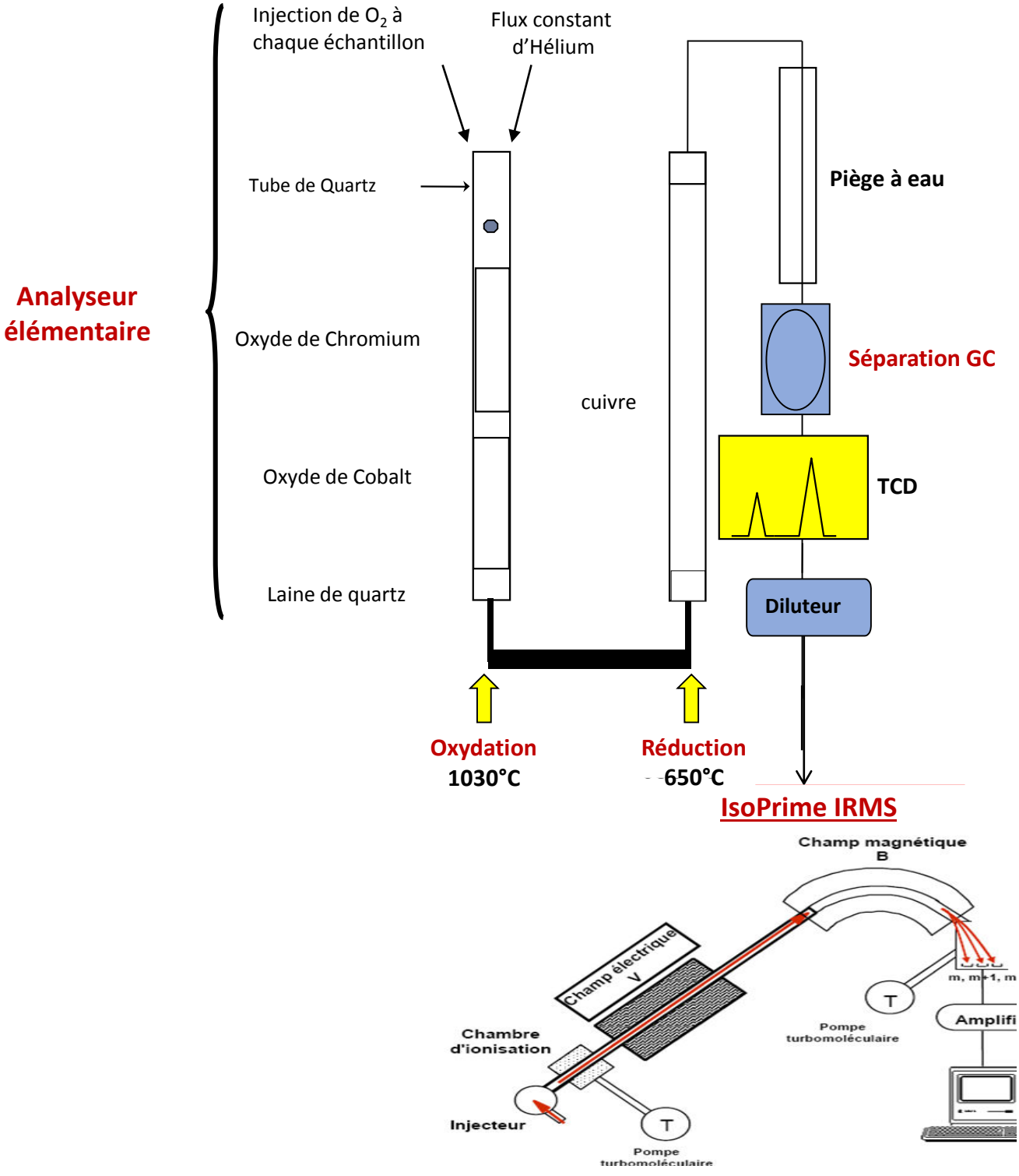


Fig. III.7. Analyseur élémentaire C/N/S (EA3000, Eurovector, Milan, Italie) couplé à un spectromètre de masse de type Isotope Ratio Mass Spectrometer (IRMS). Cet équipement a été utilisé pour déterminer la composition élémentaire isotopique des échantillons en N. GC: Gas chromatography (chromatographie en phase gazeuse) ; TCD: Thermal Conductivity Detector (détecteur à conductibilité thermique).

B.II. Analyses élémentaires et biochimiques

B.II.1. Détermination des teneurs en N et ^{15}N

Le système utilisé pour déterminer les teneurs en N total et ^{15}N est un analyseur élémentaire C/N/S (EA3000, Eurovector, Milan, Italie) couplé à un spectromètre de masse de rapport isotopique (IRMS de marque Isoprime, GV Instrument, Manchester, Royaume-Uni) (**Fig. III.7**).

Pour chaque échantillon, 1,5 à 3 mg de poudre lyophilisée ont été déposés dans de fines capsules en étain, de façon à injecter 80 à 100 µg de N dans le spectromètre de masse. Les capsules contenant les échantillons sont disposées dans un injecteur placé en tête de la colonne de combustion. Leur injection dans la colonne d'oxydation est réalisée dans un flux d'hélium en légère surpression, afin d'éviter toute contamination par le gaz carbonique et l'azote moléculaire de l'air. La combustion des échantillons a lieu au niveau de la colonne d'oxydation (Oxyde de chromium et de colbalt à une température de 1030 °C). Une élévation de température (1600 °C) assurée par un apport d'oxygène conduit à une combustion rapide et totale des échantillons. A la sortie de la colonne d'oxydation, l'échantillon se trouve sous forme de N_2, CO_2, H_2O et d'oxydes de carbone et d'azote. La réduction de ces derniers en N_2 et CO_2 est alors assurée par passage sur une colonne de cuivre métallique à 650 °C (colonne de réduction). Le piégeage de l'eau et du CO_2 est réalisé par passages successifs sur deux colonnes contenant respectivement du perchlorate de magnésium et du carbosorb® (PDZ Europa).

L'N_2 est alors injecté dans le spectromètre de masse où il est d'abord ionisé. Les ions moléculaires positifs ainsi formés sont accélérés dans une chambre électrique, puis déviés par un champ magnétique. Leur angle de déviation est directement affecté par le rapport de leur masse (m) sur leur charge (z). Toutes les molécules de N_2 ionisées étant de même charge, leur angle de déviation varie donc uniquement en fonction de leur masse. Ainsi, la déviation du N_2 de masse 28 ($^{14}N^{14}N$) sera plus importante que celle du N_2 de masse 29 ($^{14}N^{15}N$), elle-même plus importante que celle de l'azote de masse 30 ($^{15}N^{15}N$). Les ions sont ensuite collectés par trois détecteurs. Les signaux qui en résultent sont ensuite amplifiés puis transmis à un système informatique. La quantification du N est réalisée en faisant la somme des signaux obtenus à partir des masses 28 ($^{14}N^{14}N$), 29 ($^{14}N^{15}N$) et 30 ($^{15}N^{15}N$).

L'analyse IRMS fournit directement le pourcentage d'azote (% N) dans la matière sèche (MS) qui permet de calculer la quantité de N (QN) dans un échantillon :

$$\boldsymbol{QN} = \frac{\%N \times MS}{100}$$

avec MS = matière sèche de l'échantillon

L'abondance isotopique (A %) a également été déterminée par l'IRMS *via* cette formule :

$$\boldsymbol{A}\% = 100 \times \frac{^{15}N}{(^{15}N + {}^{14}N)}$$

avec le ^{15}N = quantité d'isotope de masse 15 et ^{14}N = quantité d'isotope de masse 14

L'excès isotopique (E %) correspond à la différence entre l'abondance isotopique d'un échantillon et l'abondance naturelle. Pour l'N, l'abondance naturelle de référence provient de plantes non marquées, soit 0,3660 % :

$$\boldsymbol{E}\% = A\% - 0{,}3660$$

L'excès isotopique a été utilisé pour estimer la quantité de ^{15}N (µg) (Q^{15}N) :

$$\boldsymbol{Q^{15}N} = (E\% \times QN) \times 1000$$

B.II.2. Extraction et quantification d'acides aminés

Les acides aminés sont extraits à partir de 10 mg de matière sèche lyophilisée repris dans une solution de 400 µl de méthanol contenant 0,625 nmol/µL de Norvaline utilisé comme étalon interne (Sigma-Aldrich). Après 15 minutes d'agitation de l'extrait, 200 µL de chloroforme et 400 µL d'eau ultra-pure sont ajoutés. Après centrifugation (12000 rpm, 10 °C, 5 minutes), le surnageant est récupéré, évaporé et repris dans 100 µl d'eau ultra-pure. L'ensemble est filtré sur un filtre (0,2 µm) et dérivé en utilisant un tag Ultra Derivatization Kit AccQ (Waters) en suivant le protocole préconisé par le fabricant (Waters). Le profil des acides aminés est déterminé en utilisant le système UPLC/PDA H-Class avec une colonne BEH C18 100x2,1 mm (Waters). Pour chaque échantillon végétal, cette analyse nous permet de déterminer (i) les teneurs de 17 acides aminés différents et (ii) la teneur en acides aminées totaux.

B.III. Analyses protéomiques

B.III.1. Extraction et dosage des protéines solubles

Les protéines solubles sont extraites à partir de 200 mg de matière fraîche finement broyés dans un mortier en présence d'azote liquide et de 500 µl de tampon citrate-phosphate (20 mM de citrate, 160 mM de phosphate, pH 6,8 contenant 50 mg de PVPP). Dans le cas des extraits protéiques servant à l'analyse des activités protéasiques, les 500 µl de tampon citrate-phosphate sont remplacés par 500 µl d'eau désionisée comme décrit par Poret *et al.,* (2016). Les échantillons sont ensuite centrifugés (1 h, 12 000 g, 4°C) avant de récupérer le surnageant contenant les protéines solubles.

La concentration en protéines est déterminée en réalisant un dosage colorimétrique en microplaque basé sur la méthode de Bradford (1976). Afin de réaliser ce dosage, 200 µL de réactif de

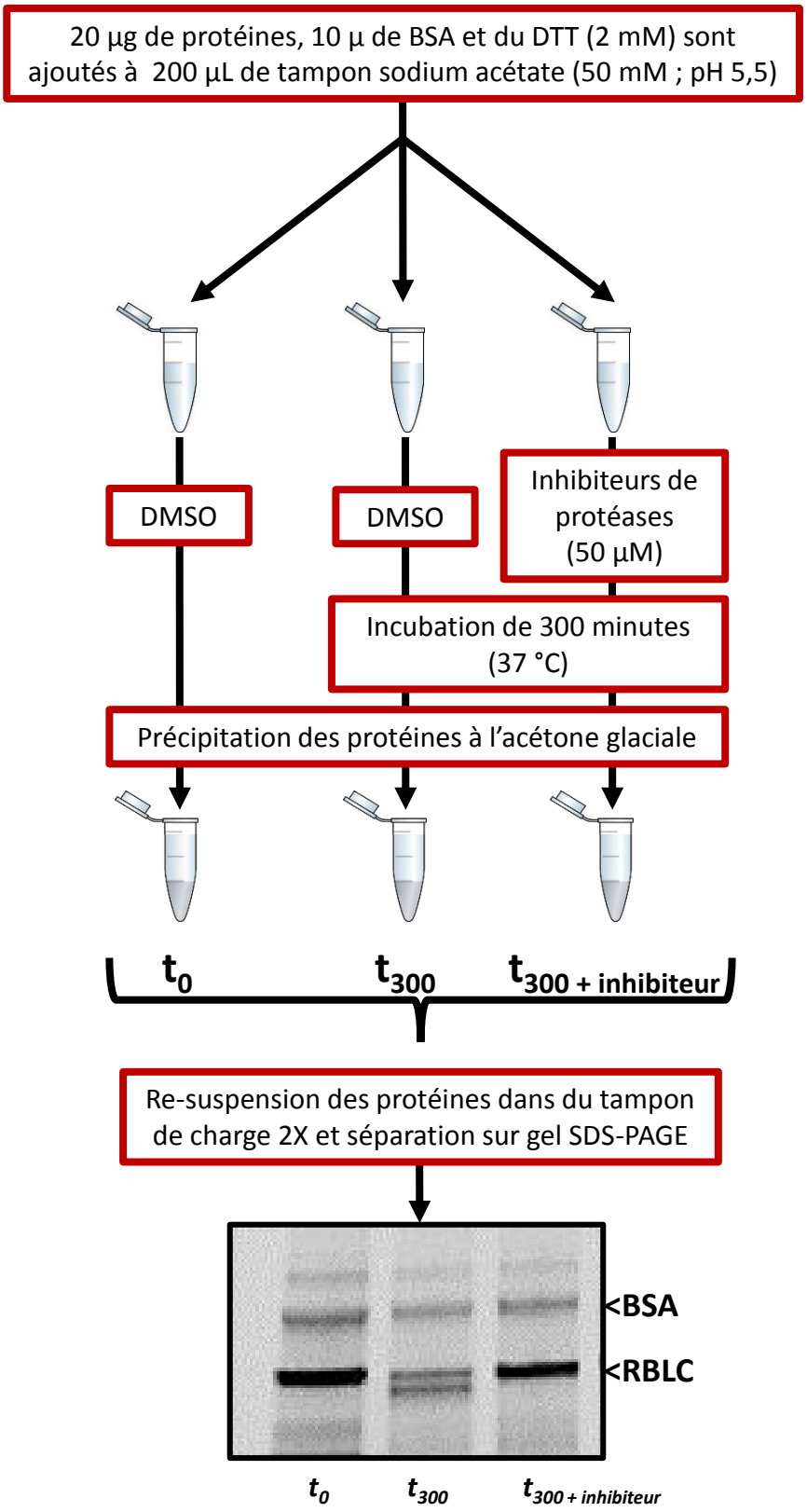


Fig. III.8. Protocole utilisé pour l'analyse de l'activité des différentes classes de protéases. L'utilisation d'inhibiteurs de protéases associée au suivi de la dégradation de différentes protéines endogènes (ex : RuBisCO) et exogènes (BSA). BSA : Bovine Serum Albumin, RBLC : RuBisCO Large Chain. Le gel présenté montre les bandes correspondant à la protéine exogène (BSA) et endogène (RubisCO, RBLC) dans l'extrait de protéines foliaires non incubé (t_0), incubé 300 minutes sans inhibiteur de protéases (t_{300}) et incubé 300 minutes avec un inhibiteur de protéases ($t_{300 + inhibiteur}$). Dans cet exemple l'inhibiteur utilisé est E64 spécifique des protéases à cystéine.

Bradford (BioAssay dilué 4 fois, Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) sont ajoutés à 10 µl d'extrait protéique préalablement dilué (2, 5 ou 10 fois). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance est mesurée à 570 nm par un lecteur de microplaque (TECAN, Männedorf, Suisse). La concentration est déterminée à partir d'une gamme étalon de sérum d'albumine bovine (BSA, Sigma-Aldrich) dont les concentrations sont comprises entre 0 et 0,8 µg. μL^{-1}.

B.III.2. Analyses de l'activité des différentes classes de protéases

L'activité protéolytique des différentes classes a été déterminée par l'analyse de la dégradation *in vitro* de protéines en présence (ou non) d'inhibiteurs spécifiques de classes de protéases selon un protocole adapté de Girondé *et al.*, (2015*b*) (**Fig. III.8**).

20 µg de protéines solubles sont incubés dans un mélange réactionnel de 200 µl contenant 50 mM de tampon Na-acétate (pH 5,5), 2 mM de dithiothreitol (DTT) et 10 µg de BSA servant à contrôler l'homogénéité du dépôt mais également à quantifier l'activité protéasique (cas des activités protéasiques foliaires). Pour analyser l'activité des différentes classes de protéases, 50 µM d'inhibiteur spécifique d'une classe de protéases, E-64 (protéase à cystéine) ; Aprotinin (protéase à sérine) ; Pepstatin A (protéase à aspartate) dilué dans le diméthylsulfoxide (DMSO) sont ajoutés. Pour obtenir l'activité protéasique totale (TP_{act}), l'inhibiteur de protéases a été substitué par 2 µl de DMSO.

Après ajout du mélange réactionnel, les protéines ont été précipitées avec 1 mL d'acétone glaciale, soit immédiatement pour obtenir un témoin sans dégradation (t_0), soit après incubation au bain marie durant 300 minutes (t_{300}) à 37 °C sous agitation. Le culot obtenu après 15 minutes de précipitation à 4 °C puis centrifugation (15 minutes, 16 000 g, 4 °C) est resuspendu dans du tampon de charge 2X (140 mM sodium dodecyl sulfate, 200 mM Tris, 20 % glycerol, 5 % β-mercaptoethanol, 0,3 mM Bromophenol Blue). Après dénaturation des protéines par chauffage à 90 °C pendant 10 minutes, l'extrait protéique est séparé (10 minutes 150 V puis 25 minutes 200 V) sur un gel SDS-PAGE precast Stainfree gel (4-15 % acrylamide gradient; Mini-PROTEAN® TGXTM Stain Free, Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) et scanné sous lumière UV avec le scanner Gel Doc™ EZ (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). L'analyse des protéines d'intérêt qui serviront à quantifier l'activité protéasique des différentes classes a été réalisée à l'aide du logiciel Image Lab™ (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). Concernant les extraits protéiques foliaires, nous avons quantifié la protéolyse à pH 5,5 en suivant la dégradation de deux protéines : une protéine exogène (BSA) apportée en quantité constante et une protéine endogène (la grande sous-unité de la RuBisCO : RBCL). Pour les extraits protéiques racinaires, compte-tenu de l'absence de RuBisCO, la dégradation de 4 bandes

Tableau III.2: Présentation non-exaustive des différentes sondes (fluorescentes ou biotinylées) permettant la détection des différentes classes de protéases actives ainsi que les inhibiteurs associés (d'après Patricelli *et al.*, 2001; van der Hoorn *et al.*, 2004; Kolodziejek *et al.*, 2011; Hoorn and Kaiser, 2012; Lu *et al.*, 2015)**.**

Classes de protéases	**Sous familles**	**Inhibiteurs**	**Sondes avec un tag fluorescent**	**Sondes avec un tag biotine**	**Références**
protéases à cystéine	PLCPs	E64	MV201	DCG04	van der Hoorn *et al.*, 2004
	Aleurain-like protease	E64	FY01		Lu *et al.*, 2015
	VPE	Ac-YVAD-cmk	JOPD1		Lu *et al.*, 2015
Protéases à sérine		DFP ou Aprotinin	FP-Rh	FP-biotin	Patricelli *et al.*, 2001
Protéasome		Epoxomicin	MVB072	MVB072	Kolodziejek *et al.*, 2011
Metalloprotéases		1-10 Phenantroline	-	-	-
Protéase à Aspartate		Pepstatin A	-	-	-

protéiques (masses moléculaires : 95KDa; 76KDa; 50KDa et 37KDa) correspondant à des protéines endogènes a été suivie.

L'activité protéolytique a été calculée de la manière suivante :

(1) L'activité protéolytique totale (TP_{act} exprimée en $\mu g_{(\text{protéines d'intérêt})}\ h^{-1}\ \mu g^{-1}$ protéine totale):

$$TP_{act} = \frac{Q_{(\text{protéines d'intérêt})t0} - Q_{(\text{protéines d'intérêt})t300}}{Q_{(tot)t0}} \times \frac{60}{300}$$ Ou Q représente la quantité de protéines (µg)

(2) Activité des classes de protéases (PC_{act} exprimée en %) :

$$PC_{act} = \frac{[Q_{(\text{protéines d'intérêt})t0} - Q_{(\text{protéines d'intérêt})t300}] - [Q_{(\text{protéines d'intérêt})t0} - Q_{(\text{protéines d'intérêt})t300\ Inhib.}]}{Q_{(\text{protéines d'intérêt})t300}} \times 100$$

B.III.3. Analyse de l'activité des protéases à sérine *via* l'utilisation de sondes fluorescentes

L'activité des protéases à sérine d'un extrait protéique contenant la protéine WSCP1 a été déterminée en utilisant une technique appelée ABPP pour «Activity-binding protein profiling ». Cette technique fait référence à l'utilisation de sondes activité-dépendantes possédant un tag fluorescent (ou biotine) spécifique d'une classe de protéase active (Patricelli *et al.*, 2001 ; van der Hoorn *et al.*, 2004 ; Kolodziejek *et al.*, 2011 ; Hoorn et Kaiser, 2012 ; Lu *et al.*, 2015 ; **Tableau III.2**)

Pour réaliser cela, 20 µg d'extrait protéique sont incubés dans un mélange réactionnel de 200 µL contenant du tampon tris (50 mM, pH 7,5). Le mix est incubé durant 30 minutes à température ambiante afin d'activer les protéases avant l'ajout de 0,25 µM de sonde FP-Rh (sonde fluorescente spécifique des sérines protéases ; Patricelli *et al.*, 2001). En parallèle, deux témoins avec et sans sonde sont réalisés, chacun composé d'un extrait de chaque échantillon auxquel est ajouté 0,25 µM de sonde FP-Rh ou 1 µL de DMSO pour le contrôle sans inhibiteur (NPC : No probe control). Après l'incubation des différents extraits durant 1 heure à température ambiante, sous agitation et à l'obscurité, les protéines sont précipitées par addition de 1 mL d'acétone glacial. Après précipitation durant 15 minutes à 4 °C, les protéines sont centrifugées (15 minutes, 16 000 g, 4 °C) permettant l'obtention d'un culot qui est ensuite resuspendu dans du tampon de charge 2X (140 mM sodium dodecyl sulfate, 200 mM Tris, 20 % glycerol, 5 % β-mercaptoethanol, 0,3 mM Bromophenol Blue). Après dénaturation des protéines par chauffage à 90 °C pendant 10 minutes, l'extrait protéique est séparé (15 minutes 150V puis 60 minutes 200 V) par SDS-PAGE (gel de concentration de polyacrylamide à 6 % (p/v) ; gel de séparation de polyacrylamide à 12 % (p/v)) à l'aide d'un tampon de migration Tris/SDS/Glycine (25 mM ; 0,1 % ; 192 mM ; pH 8,8). La

Tableau III.3. Composition des gels SDS-PAGE utilisés pour la séparation des protéines foliaires lors des zymmogrammes d'activité protéasique. Le gel SDS-PAGE est composé d'un gel de concentration (6% d'acrylamide) et d'un gel de séparation (10% ; gélatine 0,1%) SDS : Sodium Dodecyl Sulfate, APS : Ammonium Per Sulfate.

Produits	Gel de concentration	Gel de séparation
% Acrylamide	6 %	10 %
Acrylamide 30,8%	3 mL	8,1 mL
Eau ultra-pure	8,6 mL	10,3 mL
Tris (1 M pH 6.8)	4 mL	/
Tris (1,5 M pH 8.8)	/	6,25 mL
SDS (10%)	/	250 µL
TEMED	22 µL	12,5 µL
APS (10%)	92 µL	62,5 µL
Gélatine	/	0,1%

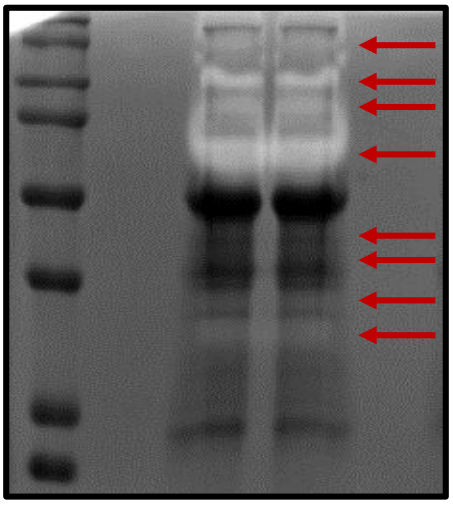


Fig. III.9. zymogramme d'activité protéasique obtenus à partir de protéines solubles extraites de feuilles d'*Arabidopsis thaliana*. Après coloration du gel au bleu de Coomassie R-250, des zones blanches (indiquées par les flèches rouges) correspondent à des zones ou des protéases sont présentes et ont digéré la gélatine contenue dans le gel.

fluorescence des protéines marquées par les sondes est visualisée à l'aide du scanner ProXPRESS 2D proteomic Imaging System (PerkinElmer) grâce à une excitation à 540 nm et une émission à 590 nm. La fluorescence est quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ (Schneider *et al.*, 2012).

B.III.4. Analyse de l'activité protéasique d'un extrait protéique par zymogramme

Les zymogrammes sont réalisés à partir d'extraits de protéines solubles comme précédemment décrit par Dominguez et Cejudo (1996). Brièvement, les extraits protéiques des différentes répétitions biologiques sont poolés. Pour chaque échantillon, à 75 µg de protéines sont ajoutés un volume identique de tampon Laemmli sans β-mercaptoethanol (Laemmli, 1970). Les protéines sont ensuite séparées (15 minutes à 150 V puis 1 heure à 200 V) par SDS-PAGE (gel de concentration de polyacrylamide à 6 % (p/v) ; gel de séparation de polyacrylamide à 10 % (p/v)) contenant 0,1 % de gélatine (p/v) (**Tableau III.3**). Après la migration en présence d'un tampon de migration Tris/SDS/Glycine (25 mM ; 0,1 % ; 192 mM ; pH 8,8), les gels sont incubés pendant 45 minutes dans 25 ml de 2-propanol (25 % ; v/v) pour favoriser la renaturation des protéines avant d'être rincés à l'eau ultra-pure. Ils sont ensuite incubés durant 16 heures à 30 °C dans 100 mM de tampon sodium acétate à pH 5,5 contenant 10 mM de DTT afin de favoriser la dégradation des protéines par les protéases présentes sur le gel. Après incubation, les gels sont colorés au bleu de Coomassie R-250 à 0,25 % pendant 24 à 48 heures avant d'être décolorés par incubation dans un mélange de méthanol (50 % ; v/v), acide acétique (10 % ; v/v). Le bleu de Coomassie permettant une coloration en bleu des protéines, la présence de bandes plus claires sur le gel indique une dégradation de la gélatine et donc la présence d'une activité protéasique (**Fig. III.9**). Pour finir, les gels sont scannés à l'aide du système GelDoc. Après découpe des zones de gel correspondant aux zones claires, un séquençage est entrepris afin de rechercher et d'identifier les protéases actives.

B.III.5. Séquençage d'une bande protéique par Q-TOF LC/MS

Les bandes claires obtenues lors du zymogramme ont été découpées afin de réaliser une identification par la plate-forme de Protéomique PISSARO de l'IFR MP 23 de l'Université de Rouen. Les bandes découpées sont lavées plusieurs fois à l'eau puis séchées. Après réduction et alkylation, une digestion à la trypsine a été effectuée durant toute la nuit à l'aide d'un système automatisé (MultiPROBE II, PerkinElmer). Les fragments de gel sont ensuite incubés deux fois pendant 15 minutes dans une solution d'acétonitrile puis une fois pendant 15 minutes dans une solution à 0,1 % d'acide trifluoroacétique permettant l'extraction des peptides des bandes de gel. Les extraits peptidiques sont ensuite séchés et

Tableau III.4. Composition des différents tampons ANODE 1, ANODE 2 et CATHODE nécessaires à la réalisation du transfert de protéines sur membrane PVDF.

Produits	Tampon Anode n°1	Tampon Anode n°2	Tampon Cathode
Méthanol	35%	35%	20%
Trizma-Base	0,3 M	0,025 M	0,025 M
SDS	0,10 %	0,10 %	0,10 %
Glycine	/	/	0,04 M
pH	10,4	10,4	9,4

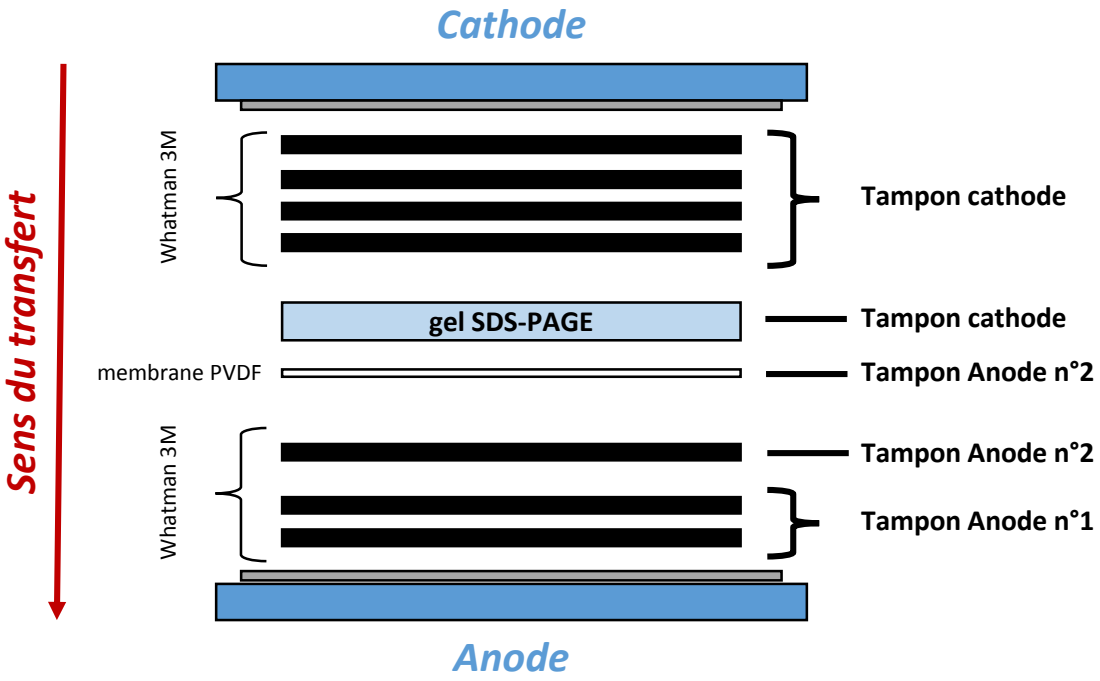


Fig. III.10. Schéma du montage réalisé pour le transfert de protéines du gel SDS-PAGE sur la membrane PVDF. Utilisation du système de transfert semi-sec PierceG2 Fast Blotter (Thermo Scientific, Bremen, Allemagne).

repris dans le tampon d'élution chromatographique, constitué de 3 % d'acétonitrile et de 0,1 % d'acide méthanoïque le tout dans de l'eau. Les peptides sont enrichis, séparés et analysés à l'aide d'un 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS équipé d'une interface HPLC-chip cube (Agilent Technologies, Massy, France). Ensuite, les données de fragmentation sont analysées à l'aide du logiciel Mass Hunter (version B.06.00, Agilent Technologies). Pour l'identification des protéines, les listes de pics MS/MS sont extraites, converties en fichiers au format mzdata.xml et comparées à la base de données des protéines à l'aide du moteur de recherche MASCOT Daemon (version 2.6.0; Matrix Science, Londres, Royaume-Uni). Les recherches sont effectuées sans modification fixe mais avec diverses modifications pour l'oxydation des méthionines, la carbamidométhylation et la carboxyméthylation des cystéines et pour le pyro-glutamate (Nter Q et E) et avec un maximum de deux clivages. Les spectres MS/MS sont recherchés avec une tolérance de masse de 20 ppm pour les ions précurseurs et de 0,6 Da pour les fragments MS/MS. Seuls les peptides correspondant à un score ionique individuel >24 sont pris en compte. Les protéines avec deux peptides ou plus correspondant à la séquence protéique ont été automatiquement considérées comme une identification positive.

B.III.6. Immunodection des protéines (Western-blot)

Afin de détecter la présence ou non de protéines d'intérêt, des Western-blots ont été réalisés. Pour cela, 20 µg de protéines solubles repris dans du tampon Laemmli 2x avec du β-mercaptoethanol (Laemmli, 1970) sont dénaturés par chauffage à 90 °C pendant 10 minutes. Les protéines sont séparées sur un gel SDS-PAGE precast Stainfree gel (4-15 % acrylamide gradient; Mini-PROTEAN® TGXTM Stain Free, Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). Ces gels ont la particularité de contenir des composés tri-halogénés qui réagissent avec les acides aminés tryptophanes des protéines grâce à une réaction induite sous UV à l'aide du scanner Gel Doc™ EZ muni du logiciel Image Lab™ (Bio-Rad). Le scan avant le transfert sur membrane PVDF permet de contrôler la qualité des dépôts.

Après séparation, les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF) à l'aide de trois tampons différents (Anode n°1, Anode n°2 et cathode, **Tableau III.4**). La membrane est d'abord équilibrée à l'aide de 3 bains successifs sous agitation : un bain dans du méthanol 100 % pendant 15 secondes puis un bain de 10 minutes dans l'eau et pour finir un bain de 10 minutes dans le tampon anode 2. Le gel est ensuite équilibré pendant 20 minutes dans le tampon cathode. Ensuite, un « sandwich » de transfert est réalisé à l'aide de feuilles de papiers Whatman imprégnées dans différents tampons, empilées dans l'ordre suivant : 2 feuilles imprégnées du tampon Anode n°1, 1 feuille dans du tampon n°2, la membrane PVDF, le gel SDS-PAGE et pour finir 4 feuilles imbibées du tampon cathode

(**Fig. III.10**). Le transfert des protéines du gel sur la membrane PVDF dure 10 minutes à 2,5 A/cm *via* le système de transfert semi-sec PierceG2 Fast Blotter (Thermo Scientific, Bremen, Allemagne).

Après le transfert, la membrane est incubée toute la nuit dans du tampon TBST (Tris-base 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 à 0,15 % (v/v), pH 8) contenant 3 % de lait (Régilait). Après 2 lavages de 7 minutes dans du tampon TBST, la membrane PVDF est incubée durant 1 heure avec l'anticorps primaire de lapin (anti-SAG12 1/4000 ou anti WSCP1 1/2000 dans du TBST) soigneusement lavée avec 5 bains de 5 minutes dans du TBST, puis incubée une seconde fois 1 heure avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à la peroxydase de raifort (1/10000 dilué dans du TBST, Bio-Rad®). Pour finir, 3 lavages de 7 minutes dans du TBST suivis de 2 lavages avec du TBS (Tris-base 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8) sont réalisés. La détection de la protéine immunomarquée s'effectue à l'aide du scanner ProXPRESS 2D proteomic Imaging System (PerkinElmer, Courtaboeuf) de la plateforme IMOGERE (Université de Caen Normandie, SFR ICORE) permettant la détection de la luminescence émise par la peroxydase de Raifort lorsqu'elle est en contact avec son substrat (kit de réaction de chemiluminescence ECL, Bio-Rad).

Un marqueur de masses moléculaires spécifique au western-blot est déposé en même temps que les protéines sur le gel. Il a la particularité d'être détecté par la streptactin-HRP (Bio-Rad) qui produit aussi de la chemiluminescence avec le kit de réaction de chemiluminescence ECL (Bio-Rad).

B.III.7. Immunolocalisation des protéines WSCP1 par microscopie

Les tissus végétaux sont prélevés à l'emporte-pièce (2 mm de diamètre) et mis dans une solution fixatrice (4 % paraformaldéhyde, 0,1 % Glutaraldéhyde en tampon cacodylate de sodium 0,1 M pH 7). Les tissus sont placés sous agitation 15 minutes puis sous vide pendant 1 heure afin de faire pénétrer le fixateur. Les tissus sont rincés avec du tampon cacodylate de sodium (0,1 M pH 7) puis remisés à 4 °C toute la nuit dans ce tampon avec 0,5 % paraformaldéhyde pour leur conservation.

Le lendemain, les tissus sont déshydratés à l'aide de plusieurs bains de 10 minutes (en triplicata) successifs dans de l'alcool (70 %, 95 %, 100 %) à température ambiante. Ils sont ensuite imprégnés avec la résine LR-White HARD (Thermo Fisher Scientific, USA) à l'aide de bains successifs de résine éthanol (25 %, 50 %, 75 %) d'une durée de 1 heure 30 chacun sous agitation à température ambiante. Les échantillons sont ensuite incubés toute la nuit dans un bain de LR White (100 %). Le lendemain, deux nouveaux bains de 1 heure et 3 heures dans le LR-White (100 %) sont appliqués. Les tissus sont ensuite placés dans de la résine LR-White pure et mis à polymériser pendant 24 heures à 50 °C dans des capsules fermées, à l'abri de l'air. La résine est ensuite démoulée et des coupes de différentes épaisseurs (1 à 5 µm) sont réalisées à

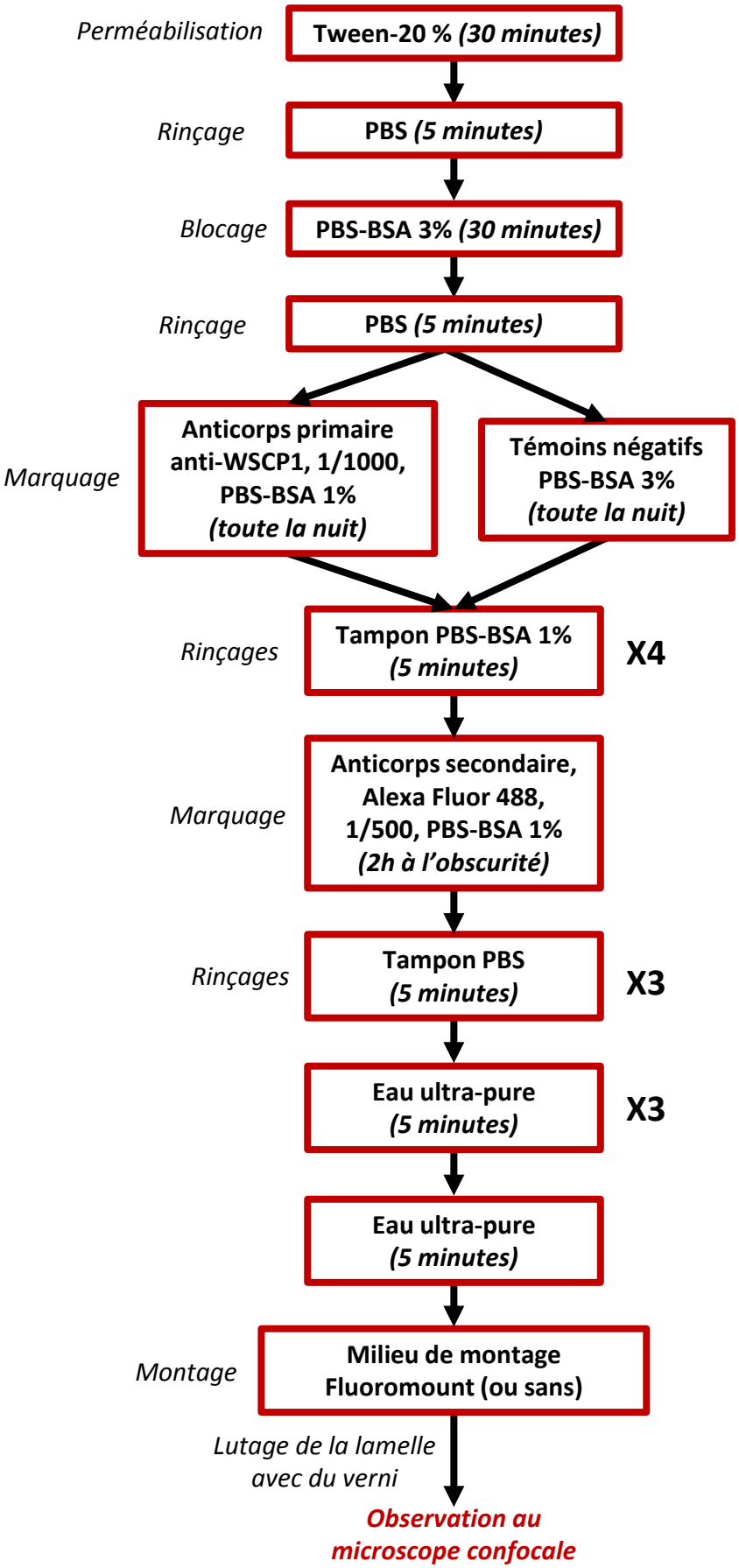


Fig. III.11. Protocole utilisé pour l'immunolocalisation en microscopie confocale d'une protéine (WSCP1 dans cet exemple) sur des coupes de feuilles sénescentes d'*Arabidopsis thaliana*.

l'aide d'un ultra-microtome (Leica Ultracut R) avant de les déposer sur une lame adhésive et les laisser sécher quelques minutes à l'étuve à 30°C.

Après fixation, les coupes sont immunomarquées (**Fig. III.11**). Pour cela, elles sont imperméabilisées avec du PBS-triton X100 à 0,1% pendant 10 minutes puis rincées deux fois avec du PBS durant 5 minutes. Ensuite, un blocage des sites non spécifiques est réalisé durant 30 minutes dans un bain de PBS-BSA 3 % sous agitation et à température ambiante suivi d'un rinçage de 5 minutes dans du PBS. Elles sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire de lapin anti-WSCP1 (1/1000 dans du PBS-BSA 1%) durant toute la nuit sous agitation à température ambiante en condition humide pour éviter tout desséchement. Des coupes témoins non incubées dans l'anticorps primaire sont laissées dans la solution de blocage (PBS-BSA 3 %). Ensuite, 4 rinçages d'une durée de 5 minutes chacun sont réalisés avec du PBS-BSA 1 %. Une seconde incubation avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin Alexa Fluor 488 (1/500 dans du PBS-BSA 1 % ; Thermo Fisher Scientific, USA) est réalisée durant 2 heures à température ambiante et à l'obscurité sous agitation suivie par 3 rinçages de 5 minutes avec du tampon PBS et 2 rinçages de 5 minutes avec de l'eau ultra-pure. Une goutte de milieu de montage Fluoromount (Thermo Fisher Scientific, USA) est ajoutée avant que l'échantillon soit recouvert d'une lamelle scellée à la lame à l'aide de vernis à ongle. Après 1 heure de séchage, les coupes peuvent être observées au microscope confocal (Olympus FV 1000). L'anticorps secondaire Alexa Fluor 488 a la caractéristique d'émettre de la fluorescence à 525 nm après avoir été excité à 488 nm par un laser.

B.IV. Méthodes d'analyses biomoléculaires

B.IV.1. Extraction des ARNs totaux (ARNs) au phénol chaud et Reverse Transcription

Les ARNs totaux sont extraits à partir de 200 mg de matière fraîche foliaire ou racinaire préalablement broyés dans un mortier en présence d'azote liquide. La poudre est reprise avec 750 µL de tampon d'extraction (LiCl 100 mM, Tris base 100 mM, EDTA 10 mM, SDS 1 %, pH 8) et 750 µL de phénol chaud pH 4 préalablement incubé à 80°C. Après un mélange au vortex pendant 40 secondes et ajout de 750 µL de chloroforme/alcool isoamylique (24/1 v/v), l'homogénat est centrifugé (15000 *g*, 5 minutes, 4 °C). Le surnageant est ensuite prélevé et 750 µL de LiCl 4 M y sont ajoutés. Après une nuit à 4 °C, une centrifugation de 20 minutes à 15000 *g* à 4 °C permet d'éliminer le surnageant et d'obtenir un culot d'ARNs totaux qui est repris avec 100 µL d'eau stérile. La solution d'ARNs est ensuite purifiée (dessalage et traitement à la DNase)

Tableau III.5. Séquences nucléotidiques et température de fusion (Tm) des différentes amorces utilisées pour l'amplification par PCR ou Q-PCR de gènes d'intérêt (ou de références). Pour chaque gène, le nombre de cycles d'amplification, PCR/qPCR est indiqué.

Gènes	Type	Séquences nucleotidiques des amorces		Tm	Nombre de cycles
Gènes d'intérêts					
SAG12	PCR	*Sens*	*5'-GGCAGTGGCACACCAMCCGGTTAG-3'*	61,5°C	26
		Anti-sens	*5'-AGAAGCMTTCATGGCAAGACCAC-3'*	68,7°C	
AED1	Q-PCR	*Sens*	*5'-CATCAGAGTTCGTTAGGGTA-3'*		40
		Anti-sens	*5'-CTCGTGCTCATCTCCAAT-3'*		
pSAG12::WSCP1	PCR	*Sens*	*5' CCCTTCTGAAGTAATCAAATTAAGAGC 3'*	60,4°C	25
WSCP1	PCR	*Sens*	*5' ATGAAGACTTTTTTTCTAGTTACTCTC 3'*	57,4°C	25
		Anti-sens	*5' GGTCTAAAGATGTTCCCATTCTACTAG 3'*	61,9°C	
Gènes de références					
EF1-α	Q-PCR	*Sens*	*5'-GCCTGGTATGGTTGTGACCT-3'*		40
		Anti-sens	*5'-GAAGTTAGCAGCACCCTTGG-3'*		
18S	Q-PCR / PCR	*Sens*	*5'-CGGATAACCGTAGTAATTCTAG-3'*		40 / 18
		Anti-sens	*5'-GTACTCATTCCAATTACCAGAC-3'*		

à l'aide du Kit Qiagen RNeasy Mini Kit en suivant le protocole préconisé par le fournisseur (Qiagen, Coutaboeuf).

Les ARNs totaux sont dosés par spectrométrie UV (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq, France) à 260 nm, une unité d'absorbance à 260 nm correspondant à 40 ng. μL^{-1} d'ARN, avant que la qualité des ARN soit vérifiée après séparation sur gel d'agarose 1%. Pour cela 1 µg d'ARNs contenu dans un volume ajusté à 5 µL avec de l'eau stérile ont été ajouté à 5 µL de tampon de charge (bleu de bromophénol 0,025 % (p/v), xylène cyanole 0,025 % (p/v), glycérol 3 % (v/v), bromure d'éthidium 0,025 % (p/v), MOPS 1X, formamide désionisé 615 µL. mL^{-1} et formaldéhyde 188 µL. mL^{-1}). Après 9 minutes de dénaturation à 70 °C et refroidissement brutal sur glace, les ARNs sont séparés (1 heure, 50 volt en présence de tampon sodium acétate 0,5X) sur un gel d'agarose 1 % contenant du bromure d'éthidium (0,5µg/ml). Les ARN sont visualisés sous UV en utilisant le système d'analyse d'images GelDoc (Bio-rad, Marne-la-Coquette) afin de vérifier leur qualité.

La synthèse d'ADNc simple brin par reverse transcription (RT) est réalisée à l'aide du kit « IScript cDNA synthesis » (Bio-Rad, Marne-la-Coquette). A 1 µg de matrice complété à 7,5 µL avec de l'eau stérile sont ajoutés 2,5 µL de Mix Iscript 5X (contenant des amorces oligo(dT15)) et 0,5 µL d'enzyme Reverse transcriptase IScript. Le mélange obtenu est incubé pendant 5 minutes à 25 °C puis 30 minutes à 42 °C et pour finir 5 minutes à 85 °C afin de stopper la réaction de RT.

B.IV.2. Polymerase Chain Reaction (PCR) et quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Les réactions de PCR sont réalisées à partir d'1 µL d'ADNc (produit de RT) auquel sont ajoutés du tampon de PCR X1 (5U/µl), 250 µM de dNTPs, 0,65 µM d'amorces sens et antisens spécifique de chaque gène d'intérêt (**Tableau III.5)** et 0,5 M de Taq polymérase (MP Biomedicals, Illkirch, France). La réaction de polymérisation est réalisée dans un thermocycleur (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) utilisant le programme suivant : après une étape de dénaturation de 5 minutes à 95 °C pour activer la Taq polymérase (hot start) et dénaturer les brins d'ADNc, une série de 3 étapes répétées X fois (X étant spécifique de chaque gènes d'intérêt **Tableau III.5**) comprenant une étape de dénaturation de 30 secondes à 95 °C, une étape d'hybridation des amorces de 30 secondes à 58 °C et une étape d'élongation d'une minute à 72 °C sont réalisées. Chaque réaction de PCR est terminée par une étape à 72 °C de 10 minutes.

A la fin de la PCR, un aliquot des produits d'amplification est séquencé et les produits de séquençage sont alignés (Multalin Interface) avec la séquence nucléique de l'ADNc du gène cible afin de vérifier la spécificité de la PCR. Les amplimères sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (1,2 % dans du TAE

1X contenant 0,5 µg mL^{-1} de bromure d'éthidium (BET)) et révélés par illumination avec la lumière UV en utilisant le scanner Gel-Doc ™ EZ Scanner (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France).

La quantification de l'expression des différents gènes a été réalisée par RT-qPCRs en utilisant les séquences d'amorces indiquées dans le **Tableau III.5**. Pour cela, à 4 µL d'ADNc issus de RT dilué 100 fois sont ajoutés 500 nM d'amorce sens et antisens et 1X SYBR Green PCR Master Mix contenant notamment la Taq polymerase (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). Les Q-PCR sont réalisées dans un thermocycler CFX96 Real-Time System (Bio-rad Marne-la-Coquette, France) programmé de la manière suivante : une étape d'activation à 95 °C pendant 3 minutes suivi de 40 cycles d'une étape de dénaturation à 95 °C durant 15 secondes puis par une étape d'hybridation/élongation de 40 secondes à 60 °C. Pour chaque couple d'amorces sens et antisens spécifique d'un gène cible, une étape de validation est préalablement réalisée à la fin de chaque cycle en appliquant le programme d'amplification à une gamme de dilution d'ANDc (1, 1/10, 1/100 et 1/1000) provenant d'un échantillon ou le gène est sensé s'exprimer. Cette étape de validation permet pour chaque couple d'amorces de vérifier l'efficacité de la PCR (la valeur doit être proche de 1), la valeur seuil de fluorescence à appliquer pour déterminer la valeur de cycle treshold (Ct) dans la phase exponentielle d'amplification. Par ailleurs suite à ces amplifications, la spécificité des amorces est également vérifiée en réalisant une courbe de fusion (augmentation progressive de la température de 50 à 90°C, incrémentation 0,2 °C) permettant de suivre la libération de fluorescence lors de la deshybridation des amplimères, la présence d'un seul pic de fluorescence présageant d'une bonne spécificité des amorces. Enfin, la spécificité n'est définitivement validée qu'après séquençage précédemment décrit pour la PCR classique.

Pour chaque échantillon, les RT-qPCR sont effectuées sur 3 répétitions biologiques. L'expression relative d'un gène cible dans chaque échantillon (sample) est comparée à celle d'un échantillon témoin (control) et est calculée à l'aide de la méthode « deltadelta Ct » (ΔΔCt) en utilisant l'équation suivante:

Expression relative du gène d'intérêt = $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$,

$\Delta Ct = Ct_{\text{gène cible}} - Ct_{\text{gènes de ménage}}$ (pour les calculs, la moyenne géométrique des Ct obtenus pour deux gènes de ménage, à savoir *EF1α* et *ARN18S* est utilisée) et $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{sample} - \Delta Ct_{control}$.

Compte-tenu de la formule, l'expression de chaque gène étudié chez le témoin est égale à 2^0, c'est-à-dire 1 et sert de référence pour déterminer l'expression relative chez les plantes traitées (Livak et Schmittgen, 2001).

Tableau III.6. **Composition du tampon de coloration utilisé pour la révélation de l'activité β-glucuronidase (GUS) dans les différents tissus des lignées d'Arabidopsis *pSA12::UIDA* .**

Produits	Tampon de coloration
Tampon phosphate (pH 7)	50 mM
Ferricyanure de potassium $(K_3Fe(CN)_6)$	2 mM
Ferrocyanure de potassium $(K_4Fe(CN)_6)$	2 mM
EDTA	20 mM
Triton X-100	0.05 %
X-Gluc	1 mM

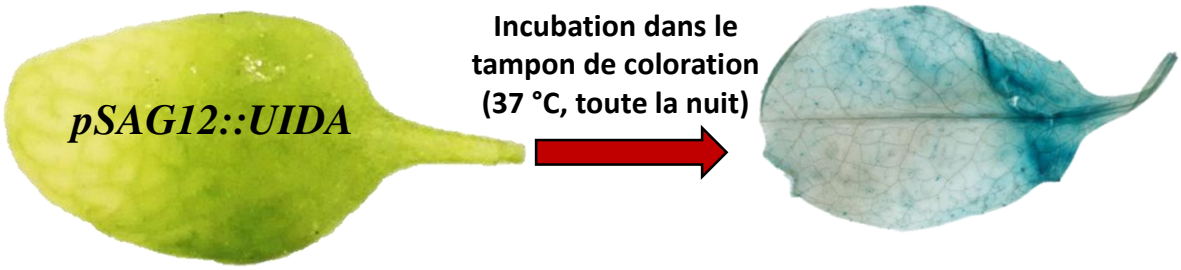


Fig. III.12. **Exemple de coloration GUS obtenue sur une feuille de lignée *pSAG12::UIDA*.**

B.IV.3. Coloration GUS

La localisation tissulaire de l'expression du gène SAG12 est obtenue par la révélation de l'activité GUS dans les différents tissus végétaux (feuilles, racines, tiges, siliques). Pour ce faire, les tissus récoltés sont directement incubés dans un tampon phosphate (tampon phosphate 50 mM à pH 7, β-mercaptoéthanol 1 %) afin de limiter le stress oxydatif. Les tissus sont ensuite transférés dans une solution de coloration (tampon phosphate 50 mM à pH 7, 2 mM $K_3Fe(CN)_6$, 2 mM $K_4Fe(CN)_6$, 20mM d'EDTA, 0,05 % Triton X-100, 1 mM X-Gluc) et dont l'infiltration dans les tissus est favorisée sous vide pendant 10 minutes. La coloration est obtenue après incubation des tissus toute une nuit à 37 °C (**Tableau III.6**).

Afin de mieux visualiser la coloration GUS (couleur bleue), les tissus chlorophylliens sont décolorés par incubations successives pendant 1 heure dans des solutions d'éthanol à 50 %, 75 %, et 96 %. Les échantillons sont ensuite placés dans une solution d'éthanol à 50 % puis dans du glycérol à 10 % avant d'être, soit montés entre lame et lamelle, soit inclus dans de l'agarose (5 %; low melting point; Roth) et coupés au vibratome (Microm 650v; Thermo Scientific; USA). Les échantillons peuvent être conservés à 4°C ou directement observés au microscope (AX70 Olympus, camera olympus SC30, Japan) (**Fig. III.12**). Une observation sous U.V. a également été réalisée afin d'observer la lignine permettant notamment une meilleure interprétation de l'organisation tissulaire des racines.

B.V. Analyses statistiques

Pour chaque analyse, un minimum de 3 répétitions biologiques sont analysées ($n \geq 3$). Toutes les données sont présentées comme la moyenne ± l'erreur standard (SE). L'ensemble des analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel R. La normalité des données a été vérifiée avec le test de Shapiro-Wilk. Les analyses de variance (ANOVA) et le test de student ont été utilisés pour comparer les moyennes. Lorsque les données ne suivent pas une loi normale, le test non-paramétrique de Kruskall-Wallis est utilisé. La significativité des tests a été fixée à $p \leq 0,05$.

CHAPITRES IV

RÉSULTATS

A. SAG12, a major cysteine protease involved in nitrogen allocation during senescence for seed production in *Arabidopsis thaliana*

Publié dans Plant and Cell Physiology *(doi.org/10.1093/pcp/pcy125)*

Contexte : Le colza est une plante de grande culture caractérisée par une mauvaise Efficience d'Usage de l'Azote (EUA). Cette faible EUA est principalement due à une mauvaise Efficience de Remobilisation de l'Azote (ERA) lors de la sénescence foliaire séquentielle qui se déroule au stade végétatif. Une amélioration de l'EUA passe donc par une optimisation de l'ERA et notamment par une amélioration de la protéolyse lors de la sénescence foliaire. De récents travaux, montrent que la protéase à cystéine SAG12 est un des acteurs de la protéolyse les plus induits lors de la sénescence chez le colza (Desclos *et al.*, 2009; Poret *et al.*, 2016). Néanmoins, son rôle reste controversé par des études, lui attribuant un rôle non essentiel à la progression de la sénescence chez *Arabidopsis thaliana*, voire un rôle de régulateur négatif de ce processus chez le riz (Otegui *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2013)

Objectif : L'objectif de ces travaux est de clarifier le rôle fonctionnel de la protéase SAG12 en focalisant plus particulièrement sur les processus protéolytiques en lien avec la sénescence.

Méthode : Afin de réaliser cette étude fonctionnelle, une approche de génétique inverse a été utilisée. N'existant pas de colza Knock Out (KO) pour le gène *SAG12*, l'étude s'est orientée sur l'espèce modèle *Arabidospis thaliana* chez laquelle un KO-*SAG12 (sag12)* était disponible. En comparaison au sauvage (Col), un phénotypage de *sag12* a été réalisé (biomasse, rendement, progression de la sénescence) aux stades végétatif et reproducteur en condition limitante en N (LN) ou non (HN). Une analyse des activités protéolytiques par classes de protéases ainsi qu'une identification des principaux acteurs impliqués dans ce processus ont été effectuées.

Résultats : Le phénotypage complet des *KO-SAG12* a permis de montrer qu'elles n'avaient pas un phénotype différent au type sauvage (Col) en condition HN. Cette absence de phénotype est expliquée par la présence de systèmes de compensations par d'autres protéases telles que les protéases à cystéines et à aspartates. Parmi les aspartates protéases compensatrices, une CND41-like (AED1) a été identifiée. De manière intéressante, lorsque la plante est en condition LN, *sag12* ne parvient pas à maintenir le rendement et le remplissage en N des graines et ce en dépit d'une induction de tous ses systèmes protéolytiques.

Conclusion : Ces résultats ont montré pour la première fois un phénotype chez *sag12.* Les mécanismes compensatoires mis en œuvre par *sag12* mettent en évidence le rôle majeur de la protéase SAG12, pour la protéolyse associée à la sénescence foliaire. Ce rôle est d'autant plus crucial pour assurer le remplissage en N des graines lorsque les plantes doivent faire face à une faible disponibilité en N. Ces travaux ont en outre permis de mettre en lumière l'implication des aspartates protéases comme acteurs majeurs de la protéolyse durant la sénescence foliaire. Une aspartate protéase en particulier (AED1) pourrait être un candidat potentiellement intéressant pour la sélection de variétés présentant une ERA améliorée.

Title: SAG12, a major cysteine protease involved in nitrogen allocation during senescence for seed production in *Arabidopsis thaliana*

Maxence James[1], Marine Poret[1], Céline Masclaux-Daubresse[2], Anne Marmagne[2], Laurent Coquet[3], Thierry Jouenne[3], Philippe Chan[3], Jacques Trouverie[1#], Philippe Etienne[1#*]

[#]Authors with equal contribution.
[1] UCN, UMR INRA–UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France.
[2] INRA-AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR1318, ERL CNRS 3559, Saclay Plant Sciences, Versailles, France
[3] CNRS UMR6270, "PISSARO" facilities of IRIB-HN, Mont-Saint-Aignan, France

Published in Plant and Cell Physiology *(doi.org/10.1093/pcp/pcy125)*

Abstract:

SAG12 is the most widely used senescence-associated reference gene for characterizing leaf senescence, and the increase in SAG12 protein during leaf senescence is remarkable. However, the role of this cysteine protease in N remobilization and the leaf senescence process remains unclear. The role of SAG12 has been poorly investigated and the few reports dealing with this are somewhat controversial. Indeed, *sag12* Arabidopsis mutants have not shown any phenotype while OsSAG12-1 and OsSAG12-2 overexpression in rice moderates senescence progression. Therefore, this study aims at clarifying the role of the SAG12 cysteine protease during the entire plant lifespan and during leaf senescence. *Arabidopsis thaliana* plants knocked-out for the *SAG12* gene (*sag12*) did not exhibit any special phenotypic traits when grown under optimal nitrogen supply (HN), suggesting that other cysteine proteases could provide compensatory effects. Moreover, for the first time, this study shows that aspartate protease activity is significantly increased in *sag12*. Among the putative aspartate proteases involved, a CND41-like aspartate protease has been identified. Under low nitrogen (LN) availability, when inducible proteolytic systems are not sufficient to cope with SAG12 depletion, a decrease in yield is observed. Altogether, these results show that SAG12 (and perhaps also aspartate proteases) could be involved in RuBisCO degradation during the leaf senescence associated with seed filling.

Keywords: Aspartate protease, cysteine protease, leaf senescence, nitrogen management, seed production, *Arabidopsis thaliana*

Running title: SAG12 a major protease for seed production

A.I. Introduction

Except for the Fabaceae, field crops are nitrogen (N) demanding plants that require high levels of N input. Switching agriculture from a productive model to a sustainable one requires reduction in the use of N fertilizers. Crop productivity then becomes more dependent on efficient N remobilization from source to sink organs (Masclaux *et al.*, 2000).

In vegetative tissues the main source of remobilized N originates from protein breakdown, which requires complex proteolytic processes to generate the amino acids and peptides that are recycled during senescence (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008; Gregersen *et al.*, 2013). Senescence progression is controlled by numerous transcription factors and enzymes (Kusaba *et al.*, 2013) that play a role at different steps in plant development and are also differentially controlled in response to biotic and abiotic environmental factors (Avice and Etienne, 2014). During leaf senescence, the degradation of cytoplasmic components and organelles is undertaken gradually, and chloroplasts, which contain more than 75% of the total N in leaves (50% in the form of RuBisCO), are the first organelles to be degraded (Hörtensteiner and Feller, 2002). Mitochondria and the nucleus remain active for longer, until cell death (Lim *et al.*, 2007), to enable the energy production required for catabolic reactions and gene expression. The Senescence Associated Genes (SAGs) induced during leaf senescence mainly consist of transporters and catabolic enzyme genes (Gan and Amasino, 1997). The hydrolases that have been identified are mostly proteases (Guo *et al.*, 2004) belonging to 5 major classes: Metalloproteases, Threonine proteases of the proteasome, Serine proteases, Aspartic proteases, and Cysteine proteases (Roberts *et al.*, 2012). These protease families are found in several cellular compartments where they are known to have different substrates and roles during senescence (Roberts *et al.*, 2012; Diaz-Mendoza *et al.*, 2016).

Metalloproteases are widely represented in the plant genome (van der Hoorn, 2008) but knowledge of their involvement in senescence is lacking (Roberts *et al.*, 2012). Only three members of this family may play a role during senescence: (i) filamentation temperature-sensitive H (FtsH), (ii) the mitochondrial processing peptidases (MPPs) and (iii) the matrix metalloproteinases (MMPs) (Flinn, 2008; Desclos *et al.*, 2009). While threonine proteases of the proteasome might participate in N remobilization during senescence (Avila-Ospina *et al.*, 2014; Girondé *et al.*, 2016), they are more likely involved in senescence-dependent regulatory pathways (Roberts *et al.*, 2012) controlling, for example, oxidative stress (Lequeu *et al.*, 2005). Serine proteases that also represent a large family in plants (van der Hoorn, 2008) might be involved in the degradation of RuBisCO and remobilizing N (Liu *et al.*, 2008; Roberts *et al.*, 2012). In rapeseed, a previous study has shown a positive relationship between effective proteolysis in

leaves during senescence under N limiting conditions and high serine protease activity (Girondé *et al.*, 2016).

Among the aspartate proteases (AP) (Schaller, 2004; van der Hoorn, 2008), several are also upregulated during natural and N-starvation-induced senescence in numerous plants species, but very little is known about their roles (Bhalerao *et al.*, 2003; Gregersen and Holm, 2007; Liu *et al.*, 2008; Desclos *et al.*, 2009). Nevertheless, involvement of CND41 in RuBisCO degradation *in vitro* was demonstrated in *Nicotiana tabacum* (Kato *et al.*, 2004, 2005; Diaz *et al.*, 2008). The increase in CND41-like protein that paralleled the decrease in RuBisCO during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* also suggested a similar feature (Diaz et al., 2008).

The cysteine protease (CP) group is certainly the most widely represented protease superfamily during leaf senescence ((Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1996; Noh and Amasino, 1999*a*; Guo *et al.*, 2004). As such, CPs could be major actors in the process associated with N remobilization during leaf senescence. Because a correlation has been shown between CP expression and N remobilization associated with senescence, several CP families could indeed play a role in N remobilization, especially by degrading stromal proteins such as RuBisCO or chloroplastic glutamine synthetase in senescence-associated vacuoles (SAVs) (Martínez *et al.*, 2008), which are lytic vacuoles independent from the central vacuole (Otegui *et al*., 2005) and located in the peripheral cytoplasm of mesophyll and guard cells (Lohman *et al.*, 1994; Noh and Amasino, 1999*a*; Otegui *et al.*, 2005). *SAG12* papain-like cysteine protease is the most widely used reference as a senescence-associated gene. Indeed, the increase in SAG12 in senescing leaves of oilseed rape during N remobilization is remarkable (Lohman *et al.*, 1994; Noh and Amasino, 1999*a*; Guo *et al.*, 2004; Desclos *et al.*, 2009; Poret *et al.*, 2016; Safavi-Rizi *et al.*, 2018), with the high *SAG12* expression level being detectable until the final stages of leaf senescence (Gombert *et al.*, 2006; Desclos-Théveniau *et al.*, 2015). SAG12 protein has been localized in SAVs. It was suggested that SAG12 participates in RuBisCO breakdown as SAVs also contain RuBisCO proteins (Martínez *et al.*, 2008; Carrión *et al.*, 2013). Due to its senescence-related pattern and its strong induction and presence in SAVs, many reports have proposed the crucial role of SAG12 cysteine protease in N remobilization during leaf senescence. Nevertheless, the few studies performed on *sag12* mutants did not reveal any phenotypic traits and especially no differences in leaf senescence progression (Otegui *et al.*, 2005). This could be explained by compensation of any defects in SAG12 protease activity via the induction of other proteases (Pružinská *et al.*, 2017). Accordingly, Otegui *et al*. (2005) demonstrated that the lack of SAG12 is not detrimental to SAV formation or for RuBisCO degradation. Finally, Singh et al. (2013) showed that OsSAG12-1 and OsSAG12-2, two homologues of SAG12 in rice, encode functional proteases that negatively regulate senescence-

related cell death. These two works thus suggests opposite roles for *SAG12* homologues in rice and in Arabidopsis.

All these studies highlight the ambiguous role of SAG12 during leaf senescence. In this context, our aim was to clarify SAG12 protease involvement in plant growth, leaf senescence and seed filling. To reach this goal, physiological and developmental traits were recorded to compare a *sag12* mutant with the Col wild type. Protease activities were monitored to detect any backup effects. Both N standard and N deprivation conditions were used to force N remobilization and exacerbate the leaf senescence phenotype in order to facilitate phenotype emergence.

A.II. Materials and methods

A.II.1. Plant growth conditions

Arabidopsis thaliana Columbia wild type (Col) and *sag12* (SALK_124030) T-DNA mutants were used in this study. Seeds were stratified for 48 h in 0.1 % agar (Select agar, Sigma, L'Isle d'Abeau Chesnes, France) at 4 °C in the dark and then sown onto lids cut from Eppendorf tubes (0.5 ml) and filled with 0.8 % agar. Eighty four plants of each genotype were placed in a glasshouse on a tank containing 10L of 3.75mM NO_3^- nutrient solution (1.25 mM $Ca(NO_3)_2.4H_2O$, 1.25 mM KNO_3, 0.5 mM $MgSO_4$, 0.25 mM KH_2PO_4, 0.2 mM EDTA.2NaFe.$3H_2O$, 14µM H_3BO_3, 5 µM $MnSO_4$, 3 µM $ZnSO_4$, 0.7 µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 0.7 µM $CuSO_4$, 0.1 µM $CoCl_2$) renewed every week for 44 days. At 44 days after sowing (DAS), plants were transferred to one of two contrasting N conditions: High Nitrogen (HN; 3.75 mM N) and Low Nitrogen (LN; 4.2 µM N). Photosynthetic photon flux density was 110 mmol m^{-2} s^{-1} and day and night temperatures were 21 °C and 18 °C, respectively. During the first 64 DAS, plants were cultivated with an 8 h light/16 h dark photoperiod and then the reproductive stage was induced with a 16h light/8h dark photoperiod.

A.II.2. Measurement of plant biomass, leaf area and nitrogen content

At 44 and 64 DAS (vegetative stage), and 125 DAS (reproductive stage) plants were harvested: a portion of the shoot and root tissues was frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for further biochemical analysis, the remaining portions being placed in an oven (60 °C, 4 days) before dry biomass weight determination. In addition, at 64 DAS, leaf ranks were separated and imaged (Canon Powershot G10, Canon, Japan, 14.8 Mpx, JPEG) to determine leaf areas. Image analysis was performed with a specific script developed for ImageJ software (Schneider *et al.*, 2012). The total areas, as well as the green area (considered non-senescent), were determined with colour detection based on the HUE component of the

Hue-Saturation-Lightness (HSL) system. The senescent leaf area was obtained from the difference between the total leaf area and the green area.

At 125 DAS, the thousand-seed weight was determined and harvest index was calculated as the seed biomass produced per one gram of plant tissue. N content was quantified in the whole plant and seeds samples with an elemental analyser (EA3000, EuroVector, Milan, Italy). The nitrogen harvest index (%) was calculated using the following formula:

$$\text{Nitrogen harvest index (\%)} = \frac{Seed\ Nitrogen\ amount}{Whole\ plant\ Nitrogen\ amount} \times 100$$

A.II.3. Determination of germination tests and seedling growth

Germination kinetic was determined for seeds from col and *sag12* plants cultivated under LN conditions. Seeds were stratified during 48 h in 0.1 % agar (Select agar, Sigma, L'Isle d'Abeau Chesnes, France) at 4 °C in the dark. Fifty mature seeds of each genotype were sown on three layers Whatman filter paper soaked with 16 ml sterile water within petri dishes (12 x 12 cm). The petri dishes were then closed and placed in growth chamber at 20°C and 70% relative humidity. Seeds that show a completed radicle protrusion through the seed-coat were considered as germinated. To monitor seedling growth, *sag12* and Col seeds were sown on water supplemented with agar (0.7 % w/v) and using a micro-scale (MSA 6.6, Sartorius, Göttingen, Deutschland), seedling fresh weight was determined at 10 DAS.

A.II.4. Extraction and quantification of soluble proteins

Soluble proteins were extracted from 200 mg of frozen fresh leaf tissue ground in a mortar with 500 µL citrate-phosphate buffer (20 mM citrate, 160 mM phosphate, pH 6.8 containing 50 mg of PVPP). For active protease profiling, citrate-phosphate buffer was replaced by 500 µL of deionized water according to Poret et al. (2016). After centrifugation (1 h, 12 000 g, 4°C), the concentration of the soluble protein extract was determined in the supernatant by protein staining (Bradford, 1976) using bovine serum albumin (BSA) as standard.

A.II.5. Proteolytic activities determination

Proteolytic activities were determined by *in vitro* protein degradation analysis adapted from Girondé *et al.*, (2015*a*). Exogenous (BSA) and endogenous (RuBisCO large chain: RBCL) proteins were used as targets of proteolysis at pH 5.5. For this, 20 µg of soluble proteins were incubated in a 200 µL reaction volume containing Na-acetate buffer (50 mM, pH 5.5) and 10 µg of BSA. Protease class activities (PC_{act})

were obtained by the addition of 50 µM of a protease class-specific inhibitor in dimethylsufoxide (DMSO): E-64 (cysteine protease), aprotinin (serine protease), and pepstatin A (aspartic protease). Furthermore, 2 mM of dithiothreitol (DTT) was added to this mixture to study cysteine proteases, and total protease activity (TP_{act}) was obtained by substituting inhibitors with an equal volume of DMSO. Then, proteins were precipitated with 1 mL of ice-cold acetone either immediately (t_0), or after incubation for 300 min (t_{300}) at 37 °C under gentle agitation. The pellet obtained after centrifugation (15 min, 16 000 g, 4 °C) was dissolved in 2X SDS-PAGE gel loading buffer (140 mM sodium dodecyl sulfate, 200 mM Tris, 20 % glycerol, 5 % β-mercaptoethanol, 0.3 mM Bromophenol Blue) and heated at 90 °C for 10 min. Then the soluble protein extracts were separated on a 4-15 % gradient in SDS-PAGE precast Stainfree gels (Mini-PROTEAN® TGXTM Stain Free, Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) and scanned under UV light with a Gel Doc™ EZ scanner (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). The proteolytic activities were calculated as follows:

(1) Total protease activity (TP_{act} expressed in $\mu g_{(BSA+RBCL)}$ h^{-1} μg^{-1} total proteins):

$$TP_{act} = \frac{Q_{(BSA+RBCL)t0} - Q_{(BSA+RBCL)t300}}{Q_{(tot)t0}} \times \frac{60}{300}$$

(2) Protease class activity (PC_{act} expressed in $\mu g_{(BSA+RBCL)}$ h^{-1} μg^{-1} total proteins) :

$$PC_{act} = \frac{[Q_{(BSA+RBCL)t0} - Q_{(BSA+RBCL)t300}] - [Q_{(BSA+RBCL)t0} - Q_{(BSA+RBCL)t300\ Inhib.}]}{Q_{(tot)t0}} \times \frac{60}{300}$$

where the amount of RBCL plus BSA ($Q_{(BSA+RBCL)}$) at t_0 and t_{300}, with (Inhib.) or without inhibitor, as well as the total amount of soluble proteins (Q_{tot}) at t_0 were quantified by using ImageLabTM software (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France).

A.II.6. Detection of proteolytic activities by zymograms

In vitro proteolytic activities were performed as reported by Dominguez and Cejudo, (1996). Soluble proteins were extracted from leaves of plants cultivated in HN conditions for 44 DAS and three replicates per genotype were pooled. Seventy five µg of each protein pool in Laemmli 2x sample buffer (Laemmli, 1970) were separated on 10 % SDS-PAGE with 0.1 % gelatin. After 45 min in 25 mL of 25 % (v/v) 2-propanol and subsequent rinsing with water, the gel was incubated at 30 °C for 16 h in a solution of 100 mM sodium acetate buffer pH 5 containing 10 mM DTT. The gel was stained with 0.25 % Coomassie R-250 blue. After gentle bleaching with a solution containing 50 % methanol and 10 % acetic acid (v/v) the proteolytic activities appearing as white areas on the blue gel were excised for protein identification.

A.II.7. Proteins identified by Q-TOF LC/MS

Excised spots were washed several times with water and dried. After reduction and alkylation, trypsin digestion was performed overnight with a dedicated automated system (MultiPROBE II, PerkinElmer). The gel fragments were subsequently incubated twice for 15 min in a CH_3CN solution and once for 15 min in a 0.1 % trifluoroacetic acid solution to allow extraction of peptides from the gel pieces. Peptide extracts were then dried and dissolved in starting buffer for chromatographic elution, consisting of 3 % CH_3CN and 0.1 % HCOOH in water. Peptides were enriched, separated and analysed using a 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS equipped with an HPLC-chip cube interface (Agilent Technologies, Massy, France). The fragmentation data were interpreted using Mass Hunter software (version B.06.00, Agilent Technologies). For protein identification, MS/MS peak lists were extracted, converted into mzdata.xml format files and compared with the protein database using the MASCOT Daemon (version 2.6.0; Matrix Science, London, UK) search engine. The searches were performed with no fixed modification but with various modifications for oxidation of methionines, the carbamidomethylation and carboxymethylation of cysteines, and for pyro-glutamate (Nter Q and E), and with a maximum of two missed cleavages. MS/MS spectra were searched with a mass tolerance of 20 ppm for precursor ions and 0.6 Da for MS/MS fragments. Only peptides matching an individual ion score >24 were considered. Proteins with two or more peptides matching the protein sequence were automatically considered as a positive identification. Among all the proteins identified (**Supplementary Table IV-A.S1**[8]), only those with a GO related to aspartate protease activity were selected and discussed in this study.

A.II.8. Western Blot of SAG12 protein

Twenty µg of proteins extracted with sodium-phosphate buffer containing pvpp were denatured by heating at 90 °C for 10 min in Laemmli 2x sample buffer with β-mercaptoethanol (Laemmli, 1970). Proteins were separated on a SDS-PAGE precast Stainfree gel (4-15 % acrylamide gradient; Mini-PROTEAN® TGXTM Stain Free, Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) and transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane as described by (Desclos *et al.*, 2008)). The PVDF membrane was incubated overnight in Tris buffer saline – Tween 20 (TBST; 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.15 % (v/v) Tween 20, pH 8) with 5 % (v/v) skimmed milk to avoid non-specific hybridization. Immunodetection of SAG12 was performed using specific polyclonal antibodies from rabbit provided by Agrisera® (1/4000 in TBST containing 5 % milk (v/v)) as the primary antibody and a second antibody coupled with peroxidase (1/10000 diluted in TBST without

[8] https://academic.oup.com/pcp/article/59/10/2052/5048665#supplementary-data

milk, Bio-Rad®). Chemiluminescence (ECL kit, Bio-Rad®) was measured by using a ProXPRESS 2D proteomic Imaging System (PerkinElmer, Courtaboeuf, France).

A.II.9. Extraction and quantification of RNAs and reverse transcription

Total RNAs were extracted from 200 mg of frozen leaf tissue previously ground in a mortar containing liquid nitrogen. The powder was suspended in 750 µL extraction buffer (100 mM LiCl, 100 mM TRIS, 10 mM EDTA, 1 % SDS (w/v), pH 8) and 750 µL of hot phenol (80 °C, pH 4). After vortexing for 40 s and after addition of 750 µl of chloroform:isoamylalcohol (24/1, v/v), the homogenate was centrifuged (15 000 g, 5 min, 4 °C). The supernatant was added to 750 µl of 4 M LiCl solution (w/v) and incubated overnight at 4 °C. After centrifugation at 15 000 g for 20 min at 4 °C, the pellet containing total RNAs was resuspended with 100 µL of sterile water. Then, total RNAs were purified with an RNeasy Mini Kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen, Courtaboeuf, France). Quantification of total RNA was performed by spectrophotometry at 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq, France) before reverse transcription (RT). For RT, 1 µg of total RNAs was converted to cDNA with an iScript cDNA synthesis kit according to the manufacturer's protocol (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) before Polymerase Chain Reaction (PCR) analyses.

A.II.10. PCR and Q-PCR analyses

Expression of the *Sag12* and *18S rRNA* genes was analysed by PCR using 1 µL of cDNA added to PCR X1 buffer (5 U μL^{-1}), 250 µM of dNTPs, 0.65 µM of forward and reverse primers and 0.5 µM of Qbiogene Taq polymerase (MP Biomedicals, Illkirch, France). The following primers were designed with primer 3+ software: *Sag12 (target gene)*: forward: 5'-GGCAGTGGCACACCAMCCGGTTAG-3'; reverse 5'-AGAAGCMTTCATGGCAAGACCAC-3' *and 18S rRNA (housekeeping gene):* forward: 5'-CGGATAACCGTAGTAATTCTAG-3'; reverse: 5'-GTACTCATTCCAATTACCAGAC-3'. PCR amplifications were performed in a thermocycler (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) using the following program: 1 cycle at 95 °C for 5 min, 20 and 18 cycles for Sag12 and *18S rRNA* including a denaturing step at 95 °C for 30 s, a primer hybridization step at 58 °C for 45 s and an amplification step at 72 °C for 1 min. Each PCR reaction was finished with one cycle at 72 °C for 10 min. The identity of each amplicon was checked by sequencing and BLAST analysis. PCR products were separated by electrophoresis on agarose gels (1.2 % in TAE 1X with 5 µg mL^{-1} of ethidium bromide (BET)) and revealed by illumination with UV light using a Gel-Doc ™ EZ Scanner (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France).

AED1 gene expression (*At5g10760)* was performed by using RT-qPCRs analysis with 4 µl of 100× diluted RT product, 500 nM of forward and reverse primers and 1X SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) in a real-time thermocycler (CFX96 Real Time System, Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). The three step program comprised of an activation step at 95 °C for 3 min and 40 cycles of a denaturing step at 95 °C for 15 s followed by an annealing and extending step at 60 °C for 40 s. Q-PCR amplifications were performed using specific primers for each housekeeping gene (*EF1-α : Forward: 5'-GCCTGGTATGGTTGTGACCT-3' ; reverse : 5'-GAAGTTAGCAGCACCCTTGG-3' ; 18S rRNA : forward : 5'-CGGATAACCGTAGTAATTCTAG-3' ; reverse 5'-GTACTCATTCCAATTACCAGAC-3')* and target genes (*AED1 : Forward : 5'-CATCAGAGTTCGTTAGGGTA-3' ; reverse : 5'-CTCGTGCTCATCTCCAAT-3').* For each pair of primers, the PCR efficiency was around 100 % and a threshold value was determined. The specificity of PCR amplification was examined by monitoring the presence of the single peak in the melting curves after RT-qPCRs and by sequencing the RT-qPCR product (Eurofins, Ebersberg, Germany). For each sample, the subsequent RT-qPCRs were performed in triplicate. The expression of the target gene in each sample was compared to the control sample (Col) and was calculated with the delta delta Ct (ΔΔCt) method using the following equation: relative expression=$2^{-\Delta\Delta Ct}$, with $\Delta\Delta Ct=\Delta Ct_{sample}-\Delta Ct_{control}$ and with $\Delta Ct=Ct_{target\ gene}-Ct_{housekeeping\ gene}$ (for calculations, the geometric mean was considered between the Ct of the housekeeping genes), where Ct refers to the threshold cycle determined for each gene in the exponential phase of PCR amplification. Using this analysis method, relative expression of the target gene in the control sample (Col) was equal to one (Livak and Schmittgen, 2001), and the relative expression of other treatments was then compared with the control.

A.II.11. Statistical analysis

For all parameters, at least three biological repeats were measured (n≥3). All the data are presented as the mean ± standard error (SE). To compare Col with *sag12* data, Student's t tests were performed after verifying compliance of normality with R software. Statistical significance was postulated at $p \leq 0.05$.

A.III. Results

A.III.1. The SAG12 mutation did not affect plant biomass but did influence yield under nitrogen depletion

Plants were grown for 44 days under standard N conditions before transfer to low nitrogen supply. At 44 DAS, no significant difference was observed for the shoot (15.91 mg ± 0.1357 mg *vs* 13.77 mg ±

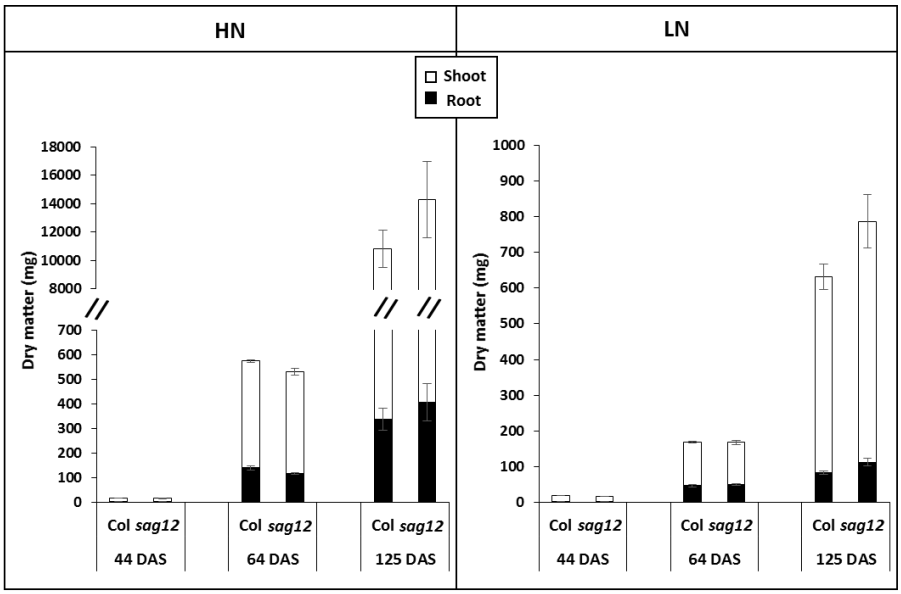


Fig. IV-A.1. Plant biomass is not different in *sag12* and Col plants, irrespective of the nitrate conditions.

The weight of the shoot and root dry biomasses was measured in plants cultivated under High (HN) and Low (LN) nitrogen conditions. Biomasses were measured at 44, 64 and 125 days after sowing (DAS). Values represent means ± SE for n=3.

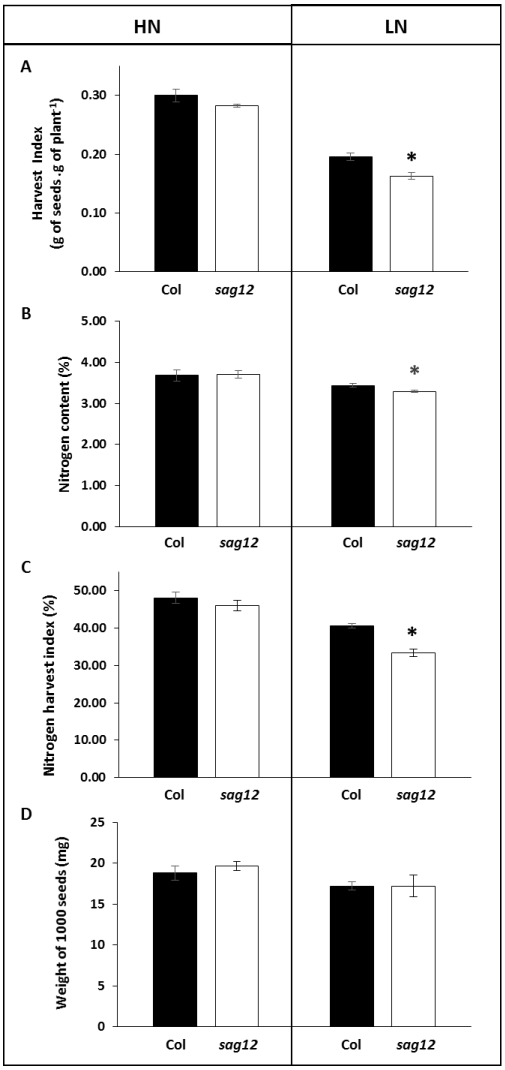


Fig. IV-A.2. Harvest index, nitrogen content and nitrogen harvest index are slightly different in *sag12* relative to Col under LN conditions.

Col (black bars) and *sag12* (white bars) plants were harvested 125 days after sowing. Plants were cultivated under high (HN) or low (LN) nitrogen conditions. Values represent means ± SE for n=4. Significant difference between Col and *sag12* ($p \leq 0.05$, n=4) is indicated by *.

0.5538 mg) and the root (3.41 mg ± 0.1327 mg *vs* 2.97 mg ± 0.1233 mg) biomasses between Col and *sag12* plants (**Fig. IV-A.1**). At 64 DAS (vegetative stage) or at 125 DAS (reproductive stage), there was no difference between the shoot and root biomasses of Col and *sag12*, whatever the nitrogen supply conditions (HN or LN). The differences in total biomass measured in both Col and *sag12* when cultivated under HN or LN conditions (17-18 fold higher in HN than LN) show that the N limiting condition was correct (**Fig. IV-A.1**).

The harvest index (*i.e.* the biomass of seeds produce per gram of plant) of Col and the *sag12* mutant were not different under HN but were significantly lower under LN (0.163 g ± 0.006 g for *sag12 vs.* 0.196 g ± 0.007 g for Col; Fig. 2A). A similar result was observed for the seed N content (**Fig. IV-A.2B**). Consequently, the nitrogen harvest index (g of N in seeds per g of N in whole plants) of *sag12* was lower relative to Col under LN but not under HN (**Fig. IV-A.2C**). No difference between Col and *sag12* could be observed in the thousand-seed weight, in the number of siliques (90.88 ± 9.64 and 118.22 ± 18.38 for Col and sag12, respectively) or the size of the siliques (12.49 mm ± 0.34 mm and 12.38 mm ± 0.22 mm for Col and *sag12*, respectively), irrespective of the N conditions (**Fig. IV-A.2D**). Consequently, these data suggest that the slight decrease in harvest index in *sag12* compared to Col observed under LN was due to a relative decrease in the number of seeds per silique rather than seed filling.

Further, phenotypic and biochemical analyses were only performed on plants at 64 DAS, *i.e.* when plants had undergone the transfer to LN conditions (or not) and still showed green tissues (which was no longer the case at 125 DAS). The choice of this time point was also justified regarding the high *SAG12* expression level and SAG12 protein content measured in Col at 64 DAS, under both LN and HN (**Supplementary Fig. IV-A.S1**).

A.III.2. Leaf area and leaf senescence are not different in Col and the sag12 mutant

Under HN conditions, the total leaf area was similar in Col and *sag12* plants (87.6 cm^2 ± 8.8 cm^2 *vs.* 84.9 cm^2 ± 8.8 cm^2). There was no difference in the number of leaves (data not shown) between Col from s*ag12*, and the total green area (81.0 cm^2 ± 6.91 cm^2 and 77.2 cm^2 ± 6.88 cm^2) and senescent area (6.6 cm^2 ± 1.93 cm^2 and 7.6 cm^2 ± 1.88 cm^2) were not significantly different. Interestingly, the leaf rank that showed at least 50 percent senescence (by area) was the same (Leaf number 6) for Col and *sag12*, indicating that the spatial progression of senescence was similar between the two genotypes (**Figs. IV-A.3A and 3B**).

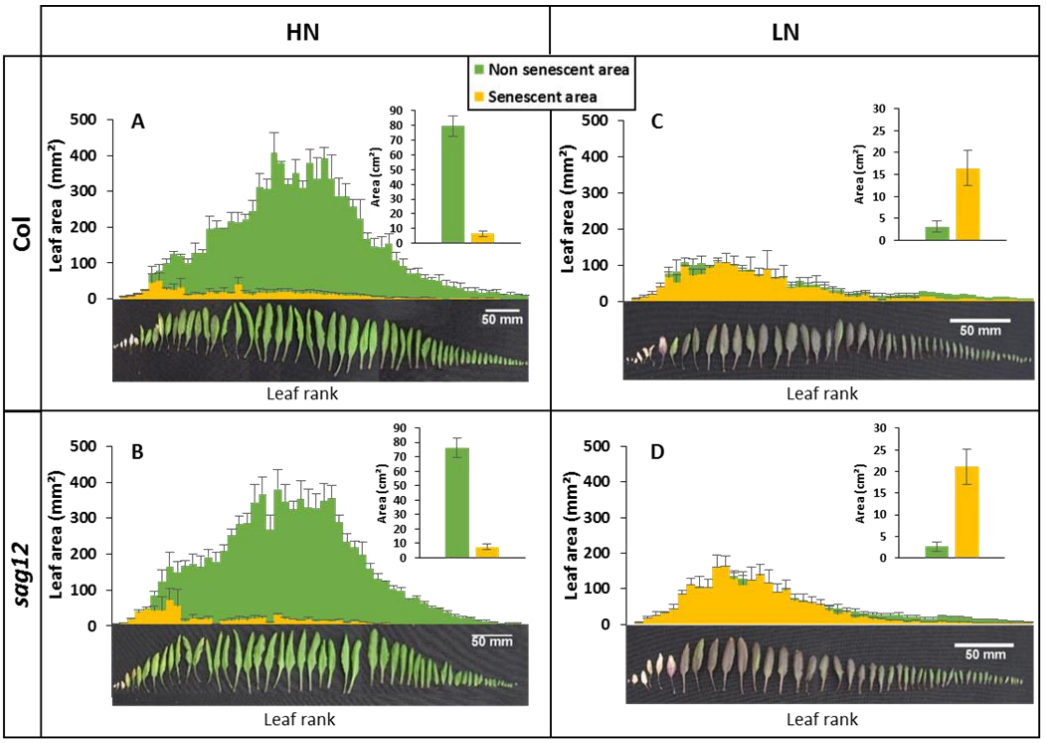


Fig. IV-A.3. Leaf areas and senescence progression are similar in *sag12* and Col.
Leaves were dissected from Col (A, C) and *sag12* (B, D) plants cultivated under high (HN; A, B) or low (LN; C, D) nitrogen conditions. Three plant replicates were dissected for each genotype. Representative pictures of rosette leaf distribution from the base to the apex of the plant are shown. For each leaf rank, stacked histograms correspond to leaf area split into senescent (yellow) and non-senescent (green) areas. Inserts present the cumulative senescent and non-senescent leaf areas in yellow and green, respectively. All analyses were performed at 64 days after sowing (DAS). Values represent means ± SE for n=3.

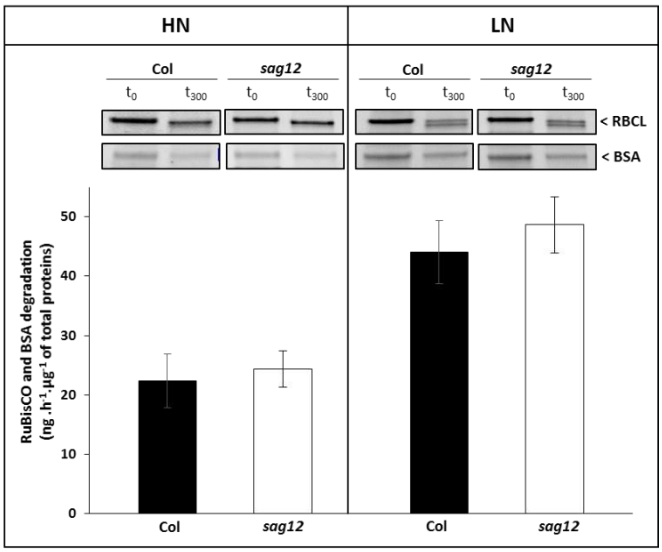


Fig. IV-A.4. The global proteolytic activities are not different in *sag12* and Col leaves.
Soluble proteins were extracted from leaves of Col and *sag12* plants cultivated under high (HN) or low (LN) nitrogen conditions. Pictures show representative Stain Free SDS-PAGE focused on the RuBisCO large chain (RBCL) and BSA bands before (t_0) and after 300 min (t_{300}) of incubation (pH 5.5 ; 37 °C). Total proteolysis activity in leaves was determined as the difference in the RBCL and BSA amounts (evaluated from the signal intensity on SDS-PAGE) between t_0 and t_{300} expressed per hour and per µg of soluble proteins loaded. The soluble proteins originate from leaves that appeared during the first 44 DAS and harvested at 64 DAS from Col and *sag12* cultivated in HN (A) and LN (B) conditions. Values are means ± SE, n=3.

Under LN conditions, and regardless of the genotype, the total leaf and senescent leaf areas were about 3.95 fold lower and 2.64 fold higher than in HN conditions, respectively. Col and *sag12* showed no significant difference for any of the traits measured, such as green leaf area (3.15 cm^2 ± 1.25 cm^2 for Col vs. 2.66 cm^2 ± 1.02 cm^2 for *sag12*), senescent leaf area (16.5 cm^2 ± 3.98 cm^2 for Col *vs.* 21.1 cm^2 ± 4.05 cm^2 for sag12) and spatial senescence progression (the last leaf rank with a 50 % senescent area was the 29th for both Col and *sag12*) (**Figs. IV-A.3B and 3C**).

A.III.3. Aspartic protease activity is greatly increased in the sag12 mutant under HN

The global protease activity at pH 5.5, which is the optimum pH for SAG12 activity, was determined by monitoring the RuBisCO large chain (RBCL) and BSA degradation rates. Surprisingly, there was no significant difference between Col and *sag12* under HN and LN conditions (**Fig. IV-A.4**). However, for both genotypes, global proteolytic activity was 2-fold higher in leaves from plants cultivated under LN than in plants cultivated under HN conditions. The strong activity recorded in LN grown plants was correlated with the appearance in the same samples of a supplemental band in the RBCL area of the stain-free SDS-PAGE gels that could have corresponded to a degradation product.

The contribution of the different classes of proteases active at pH 5.5 (cysteine, serine and aspartic proteases especially) was further monitored in the leaves of Col and *sag12* plants grown under HN and LN conditions for 64 DAS (**Fig. IV-A.5**). For each protease class, the results are expressed relative to Col. Under HN, cysteine and serine protease activities were not significantly increased. In contrast, a significant increase of 91 % ± 3.44 % was observed for aspartic protease activity in *sag12 vs.* Col. However, for the LN condition where the global protease activity is increased (**Fig. IV-A.4**), no significant difference was observed between Col and *sag12,* whatever the class of proteases considered (**Fig. IV-A.5**).

A.III.4. Identification of aspartate proteases induced in sag12

The increase in aspartate protease activity in *sag12* suggests that some aspartate proteases might compensate for the effect of the SAG12 mutation, especially under HN conditions. Considering this point and the absence of a fluorescent probe to study active aspartate proteases on-gel, zymogram analyses coupled with protein sequencing were undertaken on soluble protein extracts from Col and *sag12* plants cultivated under HN conditions for 64 DAS (**Fig. IV-A.6A and Supplementary Table IV-A.S1**[9]). On

[9] https://academic.oup.com/pcp/article/59/10/2052/5048665#supplementary-data

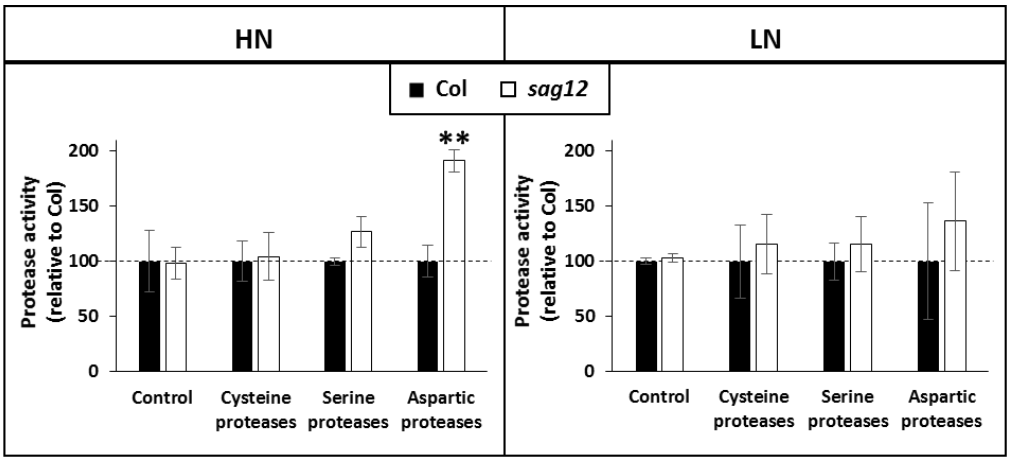


Fig. IV-A.5. Aspartic protease activity is increased in *sag12* leaves from plants grown under HN. Soluble proteins were extracted from leaves that appeared during the first 44 DAS and harvested at 64 DAS from Col and *sag12* plants cultivated under high (HN) or low (LN) nitrogen conditions. Each protein sample was supplemented with BSA and incubated (300 min, 37 °C, pH 5.5) with or without a class-specific protease inhibitor (E64 for cysteine proteases, aprotinin for serine proteases, pepstatin A for aspartic proteases). Samples were quantified by ImageLab™ software after separation in a Stain Free gel. The protein degradation by each class of proteases was determined as the difference between the amounts of BSA and RuBisCO large chain (RBCL) degraded with and without inhibitor. For each protease class, activity is expressed relative to the WT value. Control corresponds to protease activity without inhibitor. Values are means ± SE, n=3. Significant difference between Col and *sag12* (p≤0.01, n=3) is indicated by **.

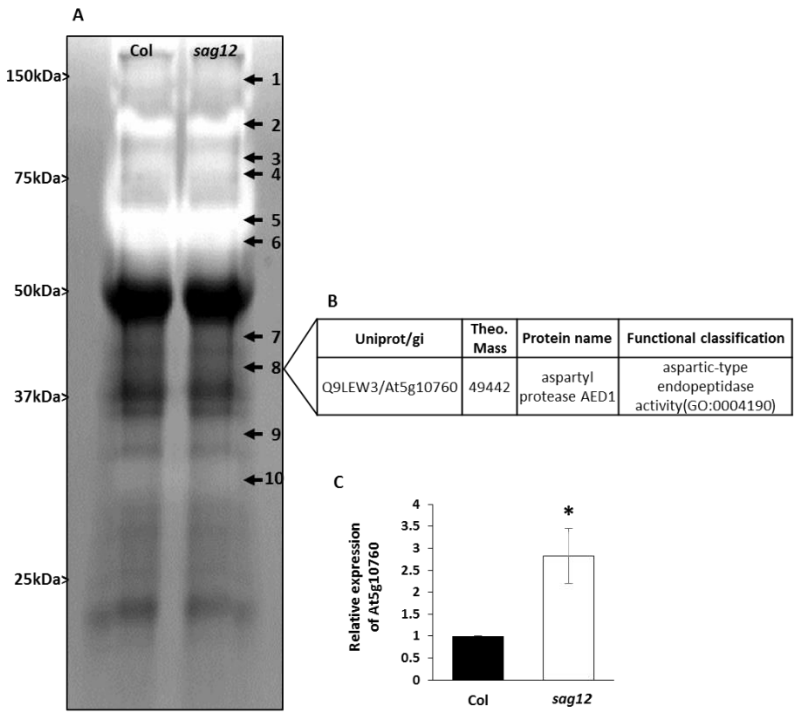


Fig. IV-A.6. Identification of the protease activities increased in the senescent leaves of *sag12*.

The soluble proteins were extracted from the Col and *sag12* leaves that appeared during the first 44 DAS and harvested at 64 DAS from plants cultivated under high nitrogen (HN) conditions. **A:** Proteolytic activities are revealed by white areas, which correspond to gelatin degradation on the zymogram after Coomassie brilliant blue staining. The white arrows (1 to 10) indicate the areas that were cut and sequenced (Supplementary Table S1). **B:** The table indicates the protease with aspartic-type endopeptidase activity GO that was specifically expressed in *sag12*. **C:** Relative expression of the gene encoding the AED1 aspartyl protease (At5g10760). Means and SE are presented, n=3, P≤0.05:*.

zymograms, 10 white areas were revealed for both genotypes (**Fig. IV-A.6**) that corresponded to a lack of substrate due to the presence of proteolytic activity. Gel bands corresponding to these areas were cut and sequenced. This allowed us to identify 475 proteins that included 13 different proteases in Col and/or *sag12* (**Supplementary Table IV-A.S1**[10]). Among these thirteen proteases, only one was identified as an aspartate protease and was detected only in *sag12*: AED1 aspartyl protease (Q9LEW3; **Fig. IV-A.6B**). The AED1 aspartyl protease may have caused the strongest increase in aspartate protease activity in *sag12* relative to Col, which is shown in **Fig. IV-A.5**. The expression of the *AED1* aspartate protease gene (At5g10760) was monitored in order to determine whether it was induced in *sag12*. The qRT-PCR results showed that the AED1 gene is overexpressed 3-fold in *sag12* compared to Col (**Fig IV-A.6C**).

A.IV. Discussion

Whatever the developmental stage (vegetative stage, bolting stage or final reproductive stage) or nitrogen regime (HN and LN), our results clearly show that the lack of SAG12 protein did not lead to significant differences in shoot and root biomasses (**Fig. IV-A.1**), in leaf areas or in senescence phenotypes (**Fig. IV-A.3**). Our analyses then confirm the absence of relevant phenotypical traits in *sag12*, in agreement with previous studies performed on the same or different *sag12* mutant alleles in Arabidopsis (Otegui *et al.*, 2005; Pružinská *et al.*, 2017). Previous work from Singh *et al*. (2013, 2016) has shown that the two OsSAG12-1 and OsSAG12-2 rice isoforms act as negative regulators of developmental and stress-induced leaf senescence in rice. The absence of a phenotype for Arabidopsis mutants affected in such a highly-induced cysteine protease is intriguing.

Indeed, cysteine proteases are the most highly induced proteases during leaf senescence (Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1996; Noh and Amasino, 1999*a*; Guo *et al.*, 2004) and among them, SAG12 is the most highly induced in *Arabidopsis thaliana* and in *Brassica napus* (Guo *et al.*, 2004; Poret *et al.*, 2016). Therefore, SAG12 should play a central role during senescence. As no phenotype can be recorded for *sag12*, the depletion of its proteolytic activity might be compensated by other protease activities. Such a hypothesis is reinforced by our observation that the global proteolytic activity is not different between both genotypes (**Fig. IV-A.4** ; **Fig. IV-A.7**) even thought a strong expression of SAG12 was observed in Col at this time . In particular, our results showed that the serine and cysteine protease activities were similar between Col and *sag12,* irrespective of the N conditions (**Fig. IV-A.5**). These results led us to the conclusion that serine protease activity is not involved in any compensatory mechanisms, and

[10] https://academic.oup.com/pcp/article/59/10/2052/5048665#supplementary-data

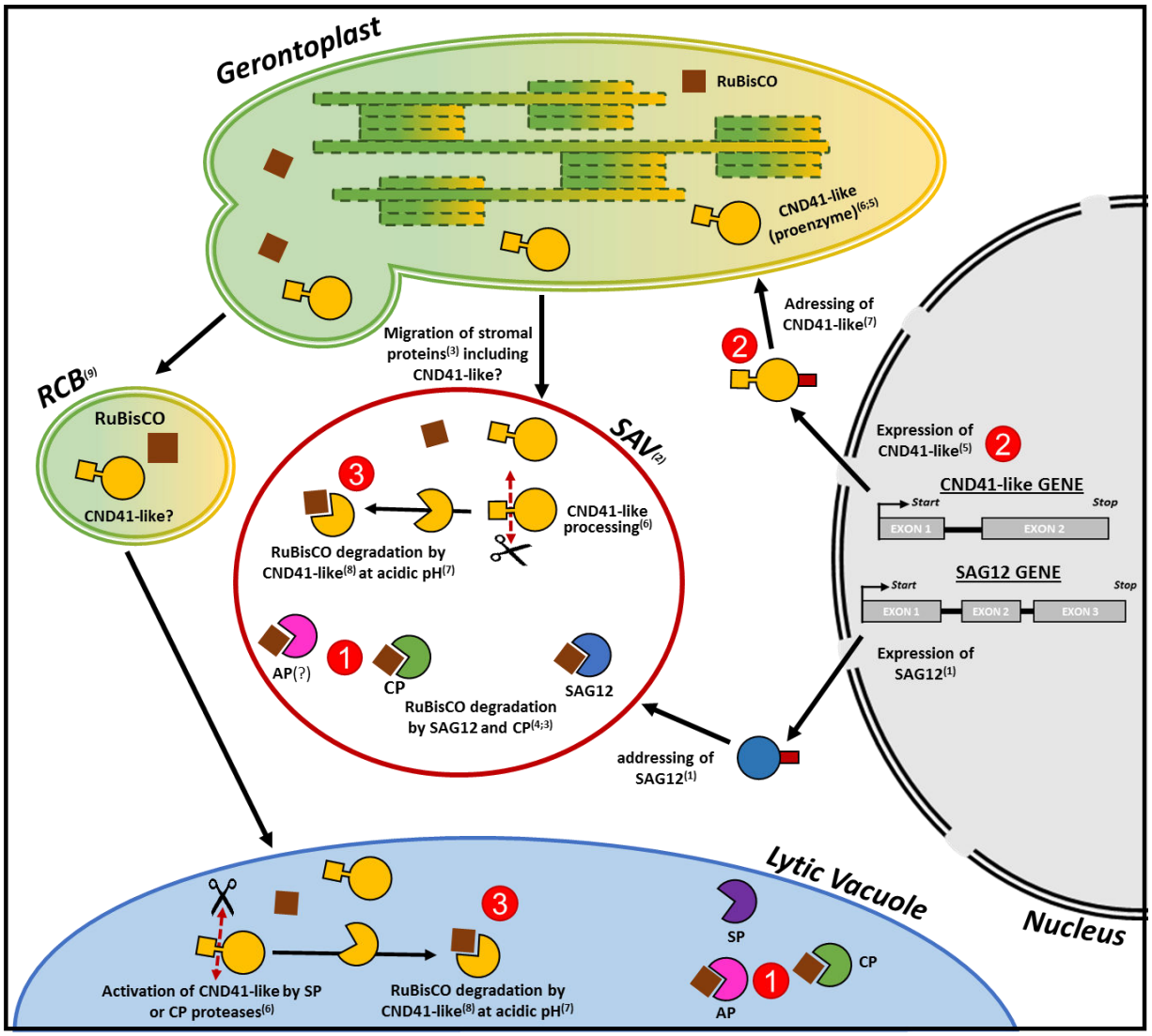


Fig. IV-A.7. Hypothetical diagram on the functioning of SAG12 and CND41-like during leaf senescence.

During senescence, the expression of the *Sag12* gene is induced (Guo et al., 2004)(1). The SAG12 cysteine protease (CP) shows a signal peptide that could explain its location in the Senescence Associated Vacuoles (SAVs; Otegui et al., 2005)(2). In these SAVs, stromal proteins including RuBisCO were found (Martinez et al., 2008)(3) where they are degraded by CPs including SAG12 (Martinez et al., 2008 ; Carrión et al., 2013)(3;4). In this study, we have shown that SAG12 depletion is compensated not only by the induction of activity from other CPs, but also by aspartate protease (AP) activity 1. Among the APs, CND41-like could be important because it was shown to be upregulated at the gene and protein expression levels and was shown to be expressed during senescence as a proenzyme targeted to the chloroplast 2 (Nakano et al., 1997, Kato et al., 2005)(5;6). Because the pH of optimal activity for the CND41-like proenzyme is acidic (Murakami et al., 2000)(7), it is possible that its subsequent processing and activation to breakdown RuBisCO (Kato et al., 2004)(8) would require its migration into the SAV or the lytic vacuole via the autophagic pathway using RuBisCO Containing Bodies (RCBs) as described for other stromal proteins (Chiba et al., 2003)(9). As shown in this study, in these compartments, APs including CND41-like could cooperate with other proteases (such as SAG12) to degrade RuBisCO during senescence 3 in order to sustain seed production.

that some cysteine proteases might be induced in *sag12* to cope with the lack of SAG12 activity (**Fig. IV-A.7**). Such a conclusion is consistent with Pružinská *et al.,* (2017) who demonstrated that cysteine proteases play redundant roles in senescing leaves and are able to substitute each other. Indeed, using pull-downs with specific CP probes (DCG-04; MV151), the same authors have shown that in the sag12 mutant also used in our study, the cysteine protease profile from *sag12* was indistinguishable from Col, suggesting that the SAG12 depletion would be compensated by other CP.

Nevertheless, the most interesting result is that CP activity was maintained and AP activity was significantly and sharply increased in the *sag12* mutant when grown under HN conditions (**Fig. IV-A.5**). This is strong evidence that SAG12 is a key factor in leaf-senescence protein degradation.

The lack of AP activity increase under LN conditions could be because all the proteolytic activities observed were already maximized to cope with the stressful N deficiency conditions imposed, and were required to ensure N remobilization for survival. This hypothesis is supported by the strong increase in the global protease activity observed in Col and *sag12* under LN conditions (2 fold higher than in HN conditions). Under such LN conditions, which do not allow an increase in N uptake because nitrate is scarce, both the Col and *sag12* mutants already compensate N deprivation by increasing protease activities. This LN-dependent increase probably masks the specific induction of aspartate proteases occurring in *sag12*. Nevertheless, it seems that in this low N availability, when the seeds rely on remobilizable nitrogen as their sole source of nitrogen, N remobilization for grain filling could be negatively affected in *sag12* under strong N depletion and could lead to decreases in seed N content and yield (**Fig. IV-A.2**). This lower N content did not affected germination kinetics and final germination rates determined at 54 hours after sowing but become detrimental for growth of seedlings cultivated during 10 days under LN condition (794 µg ± 41 µg *vs* 576 µg ± 42 µg for Col and *sag12*, respectively) (**supplementary Fig. IV-A.S2**).

An investigation into which aspartate proteases were responsible for the global increase in aspartate activity in HN conditions was undertaken. In principle, the reference method could have consisted of identifying proteases after a pull-down assay performed with probes specifically targeting active proteases (Greenbaum *et al.*, 2002; Pružinská *et al.*, 2017). Unfortunately, no specific probe is available to target active aspartate proteases via the pull-down method. Therefore, zymograms for protease activities were used instead. Indeed, the demonstration of *in gelo* degradation of gelatin allowed localization of proteolytic activities that can be identified by sequencing. Zymogram profiles were not different between *sag12* and Col, reinforcing the compensatory effect hypothesis. Nevertheless, among

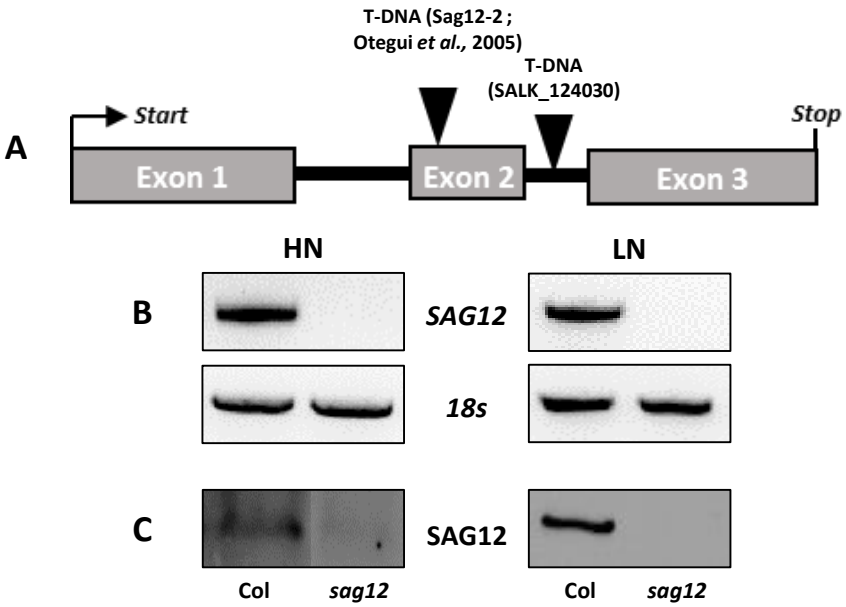


Fig. IV-A.S1. Schematic representation of the SALK_124030 T-DNA insertion and sag12 mutant genotyping.
(A) The SALK_124030 T-DNA insertion is located in the second intron of *SAG12*. (B) The expression of *SAG12* and *18S* gene (housekeeping gene) was investigated using RT-PCR. (C) Western blot of SAG12 showing the accumulation and the lack of SAG12 in Col and *sag12* leaves, respectively. The ARNs and the soluble proteins originate from leaves that appeared during the first 44 DAS and harvested at 64 DAS from Col and sag12 cultivated in HN and LN conditions.

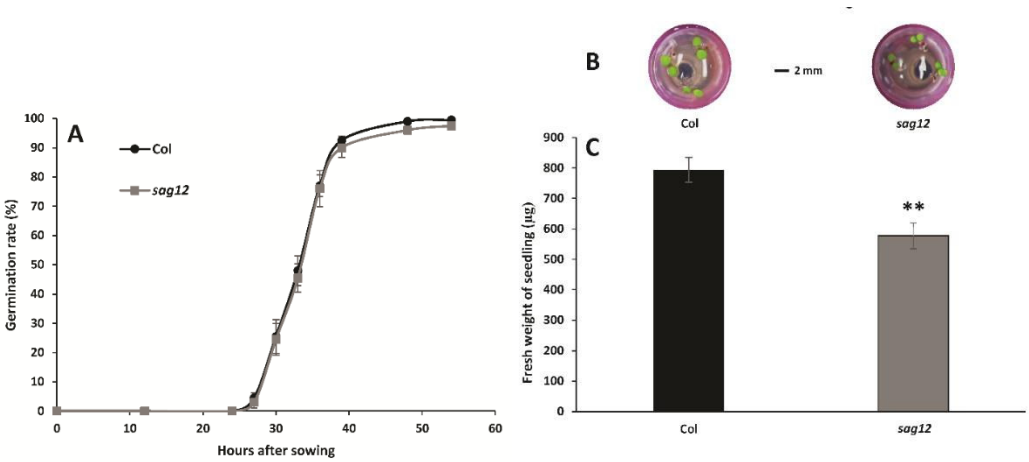


Fig. IV-A.S2. Germination kinetics (A) and seedling growth (B ; C) for seeds harvest on col (black) and *sag12* (grey) plants cultivated under LN condition.
Germination kinetics (A) were performed with seeds sown on Whatman filter paper soaked with sterile water in petri dishes. Representative picture (B) and fresh weight (C) of Col and *sag12* seedlings at 10 days after sowing (DAS). Values represent means ± SE for n=4. Significant difference between Col and *sag12* ($p \leq 0.01$, n=4) is indicated by **.

the proteases differentially accumulated in *sag12* and Col (**Supplementary Table IV-A.S1**[11]), targeted analysis of APs has allowed identification of the aspartyl protease AED1 (Q9LEW3), which is specifically accumulated in *sag12*. The upregulation (3 fold) of the *AED1* (At5g10760) gene in the senescing leaves of *sag12* relative to Col (**Fig. IV-A.6C**) reinforced the result of aspartate protease induction *in sag12* (**Fig. IV-A.6A**). Interestingly, the aspartyl protease AED1 (Q9LEW3) belongs to the CND41-like proteins that have been described as senescence-induced proteins in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* leaves (Kato *et al.*, 2004; Winter *et al.*, 2007; Diaz *et al.*, 2008); **Supplementary Fig. IV-A.S3**). Among the CND41-like proteins, Murakami *et al.* (2000) have demonstrated that in *Nicotiana tabacum* a proenzyme form of a CND41 paralogue is located in the chloroplast. Moreover, some studies have shown that CND41 is activated at acidic pH (Murakami *et al.*, 2000) and is able to degrade RuBisCO (Kato *et al.,* 2004; 2005). Taken together, these data suggest that RuBisCO degradation by a CND41-like protease is not possible directly inside the chloroplast and requires that both proteins (CND41-like and RuBisCO) be transferred to acidic compartments such as SAVs and/or the central vacuole (pH 5.5). As proposed in **Fig. IV-A.7**, CND41-like could migrate from chloroplasts to SAVs as previously demonstrated for other stromal proteins such as RuBisCO (Martínez *et al.*, 2008; Carrión *et al.*, 2013), and/or could be released into the central vacuole using RuBisCO-containing bodies (RBCs) or other pathways related to autophagy (Ishida *et al.*, 2008, 2014; Otegui, 2018). Moreover, the study of Kato *et al.* (2005) showing that a post-translational process is involved in the activation CND41 allows us to suggest that SAG12 and/or other proteases may process CND41-like in SAVs and/or lytic vacuoles to achieve this activation (**Fig. IV-A.7**).

Altogether, and in light of previous reports examining CND41, our data shows that the CND41-like aspartyl protease AED1 is a good candidate to participate in SAG12 substitution during leaf senescence in plants grown under HN conditions. This hypothesis is reinforced by Havé *et al.,* (2018) which shown that in autophagy mutant (*atg5*) under LN condition, the two most increased proteins are SAG12 (22.5 fold) and AED1 (3.33 fold). However, because zymograms are not an exhaustive method for protease identification, the induction of other aspartate proteases, cannot be excluded, and this may explain the increase in the global aspartate protease activity observed only in HN conditions (**Fig. IV-A.5**).

A.V. Conclusion

This study has shown that during senescence, *SAG12* depletion results not only in an induction of other CP activities but also AP activities. Among these APs, the CND41-like protease AED1 is especially

[11] https://academic.oup.com/pcp/article/59/10/2052/5048665#supplementary-data

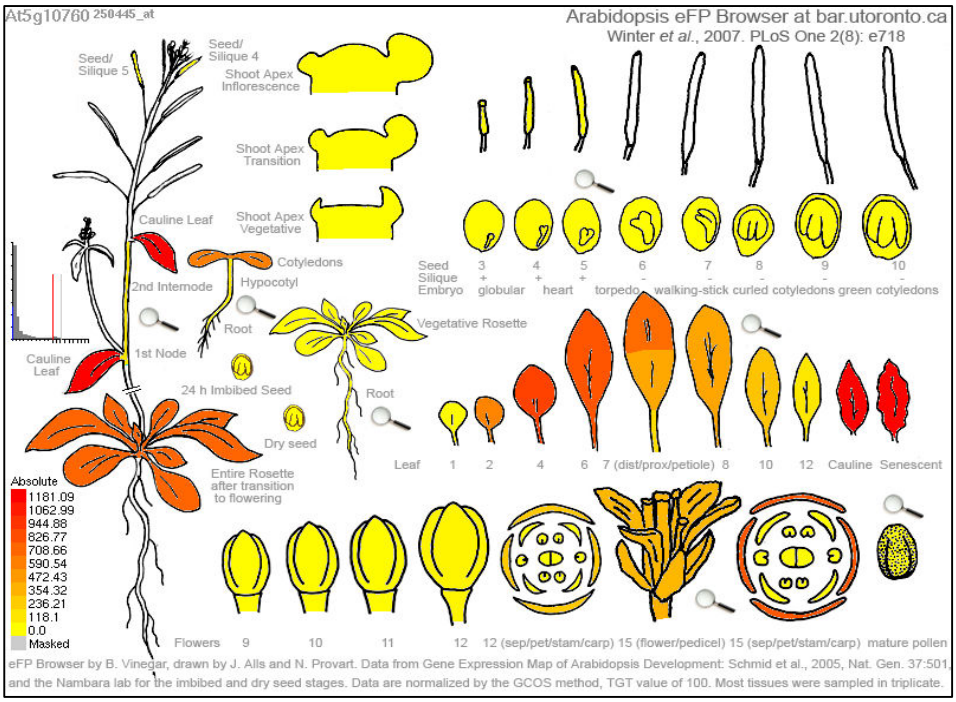


Fig. IV-A.S3. Expression pattern of the gene (At5G10760) encoding the AED1 aspartyl protease (Q9LEW3) in *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis eFP browser at bar.utoronto.ca ; Winter *et al.,* 2007)

induced to cope with the absence of SAG12 in senescing leaves of *Arabidopsis thaliana*. By making the link between the present findings and previous studies, a model describing the hypothetical role of SAG12 of CND41-like proteases in senescence-associated RuBisCO breakdown has been proposed (**Fig. IV-A.7**). Moreover, for the first time, this study has shown a phenotypical difference between Col and *sag12* plants, which was highlighted by decreases in both the seed N content and in the *sag12* mutant. Such an effect shows that SAG12 is a central protease that certainly cooperates with APs (including CND41-like) in RuBisCO degradation during leaf senescence, and participates in the N remobilization that sustains seed production.

Acknowledgments:

The authors would like to thank Dr. Nathalie Nési (UMR 1349 Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, INRA, Agrocampus Ouest, Université de Rennes) and Pr. Jean-Christophe Avice (UMR INRA–UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions N.C.S., Université de Caen Normandie) for the management of the RAPSODYN ANR program. We are most grateful to the PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) core facility for elemental analysis, to Nicolas Elie (CMABio³: Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie) for help with image analysis and to Dr. Laurence Cantrill for proofreading and English correction. 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.

Supplementary data:

Table IV-A.S1. Identified proteins from leaves of Col and sag12 plants at 64 DAS cultivated under high nitrogen (HN) conditions as revealed by zymograms with gelatin substrate. Only peptides matching an individual ion score >24 were considered. Proteins with two or more peptides matching the protein sequence were automatically considered as a positive identification. The Gene Ontologies (GOs) were provided by the panther database (pantherdb.org). The number of protein bands where the proteins were revealed are indicated (Bands), the theoretical mass (Mass (th)), number of peptide matches (Matches), number of distinct sequences (Seq). Proteins with GO proteolysis (GO:0006508) or GOs with peptidase terms or with a description corresponding to protease if no GO was available are annotated with a YES in the column "Is a protease". Identified proteases with aspartic term in GO or description re annotated with a YES in "Is an aspartate protease" column. Link to Expression profiles for gene encoding proteases are available for Genevisible ; AtGenExpress Visualization; EBI gene expression atlas websites. https://academic.oup.com/pcp/article/59/10/2052/5048665#supplementary-data

B. A new role for SAG12 cysteine protease in roots of *Arabidopsis thaliana*

Soumis à Frontiers in Plant Science - section Plant Physiology, special issue « Plant Proteases »

Contexte : Les travaux précédents (James *et al*., 2018 ; article 1) ont mis en évidence un rôle majeur de la protéase SAG12 dans la protéolyse foliaire et notamment dans le remplissage en azote des graines. Lors de l'étude fonctionnelle de SAG12, nous avons mis en évidence l'induction de protéases foliaires permettant de compenser l'absence de SAG12 lorsque les plantes sont cultivées en condition non limitante en N (HN). Cependant, l'absence de phénotype foliaire et la faible teneur en N des graines en condition LN suggèrent que chez *sag12,* la remobilisation d'N provenant d'un autre organe que les feuilles puisse être perturbée et/ou qu'une augmentation de l'absorption d'N racinaire, puisse être aussi impliquée dans la fourniture d'azote pour les graines et ainsi permettre une compensation seulement en HN.

Objectif : L'objectif est de mieux appréhender l'importance de la protéase SAG12 dans la gestion de l'N au stade reproducteur et de vérifier les hypothèses sur les mécanismes compensatoires soulevés par les travaux précédents (James *et al.,* 2018).

Méthode : Afin d'identifier les organes mis en jeu dans la remobilisation de l'azote pour assurer le remplissage des graines, un marquage de type pulse/chase au ^{15}N a été conduit sur des lignées d'*Arabidopsis thaliana* KO-SAG12 (*sag12*) et Col. De plus, une analyse comparative de l'architecture racinaire et des capacités d'absorption du NO_3^- de *sag12* et col a été entreprise afin de de vérifier une éventuelle participation des racines à la compensation de l'absence de SAG12. Enfin la localisation de l'expression de *SAG12* a été appréhendée à l'aide de lignées exprimant le gène codant la β-glucuronidase (*UIDA)* sous contrôle du promoteur *SAG12* (*promoteurSAG12*).

Résultats : L'architecture racinaire et la capacité d'absorption du NO_3^- sont similaires chez Col et *sag12*, suggérant que l'absorption de l'N ne participe pas à la compensation observée en HN chez *sag12*. Néanmoins, le marquage ^{15}N met en lumière une augmentation de l'allocation de l'N dans les racines au dépend des graines chez *sag12* cultivées en condition LN. L'utilisation de plantes transformées *promoteurSAG12*::*UIDA et* l'étude par Western-blot de SAG12 ont permis de démontrer sa présence au niveau de la stèle racinaire uniquement au stade reproducteur et particulièrement en condition de faible disponibilité en N. Comparativement à Col cultivé en condition LN, l'augmentation des teneurs racinaires en protéines et la plus faible activité des cystéines protéases dans les racines de sag12 suggèrent un rôle de SAG12 dans la dégradation des protéines racinaires.

Conclusion : Ces travaux montrent pour la première fois la présence de la protéase SAG12 dans les racines au stade reproducteur. Cette expression permettrait la mobilisation d'N racinaire essentielle au remplissage des graines, particulièrement lorsque les plantes sont confrontées à une faible disponibilité en N. L'expression de la protéase SAG12 dans les racines pourrait participer à l'explication des variations de NUE chez différents génotypes de colza en condition LN (Girondé *et al.*, 2015*a*,*b*).

Title: A new role for SAG12 cysteine protease in roots of *Arabidopsis thaliana*

Maxence James[1*], Céline Masclaux-Daubresse[3], Anne Marmagne[3], Marianne Azzopardi[3], Philippe Laîné[1], Didier Goux[2], Philippe Etienne[1#], Jacques Trouverie[1#]

[#] Authors with equal contribution
[1] Normandie Université, UNICAEN, INRA, UMR 950 EVA, SFR Normandie Végétal (FED4277), 14000 Caen, France
[2] Normandie Université, CMABIO[3], SF 4206 ICORE, 14000 Caen, France
[3] Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay, 78000, Versailles, France

Submitted to Frontiers in Plant Science - section Plant Physiology, special issue « Plant Proteases »

Abstract:

Recently it was shown that the SAG12 cysteine protease might be important for nitrogen (N) allocation to the seeds in *Arabidopsis thaliana*. Compared to the wild type Col cultivated under low nitrogen (LN) conditions, a decrease in yield and N content in the seeds was observed in the *SAG12* knockout Arabidopsis mutant (*sag12*). As no associated leaf senescence phenotype was observed, a possible involvement of SAG12 in the remobilization of N from organs other than the leaves was proposed. The fact that better root N uptake in *sag12* could also supplement N mobilization to the seed was explored. Root architecture, N uptake capacity and ^{15}N partitioning were then analyzed in both genotypes (Col and *sag12*) cultivated under high nitrogen (HN) and LN conditions. No difference in root architecture and root N uptake capacity was observed between *sag12* and Col under HN or LN conditions. However, when compared to Col under LN conditions, the ^{15}N partitioning showed that the accumulation of ^{15}N in the roots of *sag12* was detrimental to the ^{15}N allocated to seeds. The sequestration of N in the root of s*ag12* under LN was associated with an increase in the N protein content of roots and a significant decrease in the cysteine protease activity in the roots. Accordingly, we reveal here that *SAG12* is strongly expressed in the root stele at the reproductive stage and especially when plants are cultivated under LN conditions. Taken together, these results suggest a new role for SAG12 as a crucial cysteine protease involved in the root remobilization of N to ensure seed filling and to sustain yield when plants are facing low nitrogen availability.

Keywords: Cysteine protease activity, N remobilization, reproductive stage, roots, SAG12, N uptake

Running title: SAG12 a crucial protease for root senescence

B.I. Introduction

Many field crop species are high nitrogen (N) demanding plants. In the context of switching to a sustainable agricultural model, a reduction in inorganic nitrogen inputs is required. To reach this goal, it is necessary to deepen the knowledge of the physiological mechanisms related to N management in plants. Among them, senescence metabolism is essential as it allows the redistribution of nutrients from the source organs to the sink organs (Peoples and Dalling, 1988; Masclaux *et al.*, 2000; Gregersen, 2011). In contrast to other elements such as sulfur stored, which is stored as an inorganic form in vacuoles, N is mainly stored as proteins that require some proteolysis steps to generate peptides and amino acids for remobilisation to occur during senescence (Hörtensteiner and Feller, 2002; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008; Tegeder and Rentsch, 2010). Such N recycling metabolism is especially important during the reproductive stage to ensure seed N filling. Metabolic events are under the control of a large panel of transcription factors and enzymes (Kusaba *et al.*, 2013) that are also modulated by biotic and abiotic stresses such as N deprivation (Gregersen *et al.*, 2013; Avice and Etienne, 2014; Balazadeh *et al.*, 2014).

Senescence, which corresponds to catabolic pathways occurring before cell death, takes place in all organs (Wojciechowska *et al.*, 2017), but it is commonly accepted that in many plant species, leaves are the main source organs for seed filling (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008). During leaf senescence, the chloroplasts, which contain more than 75% of the total N of the leaf (50% in the form of RuBisCO), are the first organelles to be degraded (Peoples and Dalling, 1988; Hörtensteiner and Feller, 2002). In contrast, the mitochondria and nucleus remain functional until cell death (Lim *et al.*, 2007; Chrobok *et al.*, 2016), to allow the production of energy and the expression of Senescence Associated Genes (SAGs) that encode proteins necessary for transport and catabolism reactions (Gan and Amasino, 1997).

Protein degradation associated with senescence requires a multitude of proteases (Guo *et al.*, 2004). They belong to 5 major classes: Cysteine Proteases (CPs), Serine Proteases (SPs), Aspartate Proteases (APs), Metallo Proteases (MPs) and Threonine Proteases (TPs) (Guo *et al.*, 2004). Their specific role in protein breakdown during leaf senescence is not well known, and the major class overexpressed in many plant species during senescence is CPs (Guo *et al.*, 2004; Poret *et al.*, 2016). The SAG12 papain-like cysteine protease (Noh and Amasino, 1999*a*,*b*) is the most strongly induced CP in senescent leaves of *Brassica napus* L. and *Arabidopsis thaliana*, especially in plants cultivated under nitrogen limitation (Desclos *et al.*, 2008; Poret *et al.*, 2016). In addition, high SAG12 protein levels are detected in senescing leaf tissues and in fallen leaves (Desclos-Théveniau *et al.*, 2015). For all these reasons, a major role for SAG12 in N remobilization during senescence has long been proposed. Surprisingly, no difference in the

leaf senescence phenotype between Col and KO-SAG12 (*sag12*) plants has ever been observed (Otegui *et al.*, 2005; James *et al.*, 2018). Otegui *et al.* (2005) showed that a lack of SAG12 did not prevent the formation of Senescence Associated Vacuoles (SAVs), nor was their proteolytic activity affected, suggesting that other cysteine proteases accumulated in SAVs in the senescent leaves of *Arabidopsis thaliana* (Otegui *et al.*, 2005). More recently, James *et al.* (2018) confirmed the absence of a leaf senescence phenotype in *sag12*. The authors also showed that there was no difference in yield and seed N content between Col and *sag12* when cultivated under optimal N nutrition, but there was lower seed N content and yield in *sag12* when cultivated under limiting nitrogen conditions. The absence of phenotype under high nitrogen was explained by an induction of cysteine and aspartate protease activities in *sag12* that could preserve N remobilization. Nevertheless, the authors did not exclude the potential that better root N uptake in *sag12* could have maintained seed filling and plant productivity. This hypothesis is in agreement with the decrease in seed nitrogen content and yields observed in *sag12* cultivated under LN conditions. Indeed, under this particular N limitation condition, N seed filling can only be achieved by N remobilization, in spite of a possible increase in the N uptake capacity in the roots of *sag12*.

The aim of the present study was to determine whether root N uptake and/or N remobilization are involved in the preservation of seed N filling in *sag12*. Root morphology and N uptake were monitored in Col and *sag12*. Experiments using ^{15}N pulse/chase labelling were performed to investigate the distribution of ^{15}N and estimate the source and rate of remobilized nitrogen dedicated to seed filling.

B.II. Materials and methods

B.II.1. Plant growth conditions

Arabidopsis thaliana Columbia (Col) and *sag12* (SALK_124030) T-DNA mutants were used in this study. The KO-SAG12 SALK_124030 (sag12) was chosen because it was the only germplasm which was available in ABRC stock and recently characterized for some study focused on protease activities (Pruzinska *et al.,* 2017; James *et al.,* 2018). Seeds were stratified for 48 h in 0.1 % agar (Select agar, Sigma, L'Isle d'Abeau Chesnes, France) at 4 °C in the dark and then sown into Eppendorf tubes (0.5 ml) filled with 0.8 % agar (w/v) that had their bottoms removed. Plants were placed in a glasshouse on a tank containing 10L of 3.75mM NO_3^- nutrient solution with ^{15}N labelling (5% of atom excess) for 44 days in order to obtain homogeneous ^{15}N-labelled plants. The solution contained 3.75 mM $K^{15}NO_3$, 0.5 mM $MgSO_4$, 0.25 mM KH_2PO_4, 0.2 mM EDTA.NaFe.3H_2O, 1.25mM $CaCl_2$, 2H_2O 14 µM H_3BO_3, 5 µM $MnSO_4$, 3 µM $ZnSO_4$, 0.7 µM $CuSO_4$, 0.1 µM $CoCl_2$, and 0.1 µM Na_2MoO_4, and was renewed every week. At 44 days after sowing (DAS)

the ^{15}N labelling was stopped and plants were transferred to two contrasting N conditions: High Nitrogen with 3.75 mM N (HN; 1.25 mM $Ca(NO_3)_2.4H_2O$, 1.25 mM KNO_3, 0.7 µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$) and Low Nitrogen with 4.2 µM N (LN; 0 mM $Ca(NO_3)_2.4H_2O$, 0 mM KNO_3, 0.7 µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$). Photosynthetic photon flux density was 110 mmol m^{-2} s^{-1} and day and night temperatures were 21 °C and 18 °C, respectively. During the first 64 DAS, plants were cultivated with 8 h light/16 h dark photoperiod and then the reproductive stage was induced with a 16h light/8h dark photoperiod. Plants were harvested at the vegetative stage (64DAS) and at the reproductive stage: 85 DAS corresponding to seed filling and 125 DAS corresponding to mature seed stage. At each harvest time, the plant compartments present were separated, weighed and stored at -80°C for further analysis. In addition, the root and tip density was performed at 64 DAS with a flat scan (Epson expression 10000XL scanner, Suwa, Japan) coupled with Winrizho software (Regent, Québec, Canada).

B.II.2. Root N Uptake capacity analysis

Col and *sag12* plants were cultivated in HN conditions as previously described but without any ^{15}N labelling. The root N uptake analysis was performed at vegetative (64DAS) and reproductive stages (85DAS) as previously described by (Lainé *et al.*, 1993). Briefly, roots were washed twice for 1 min in a solution of $CaSO_4$ (1 mM) before immersion for 5 min in a solution of 250 µM or 2 mM $K^{15}NO_3$ (99 % of atom excess) to study N uptake by the High Affinity Transport System (HATS) or the Low Affinity Transport System (LATS), respectively. Then roots were rinsed twice in a solution of $CaSO_4$ (1 mM) at 4 °C for 1 min to stop the N uptake. Roots and shoots were separated and weighed before ^{15}N analysis by an isotope mass ratio spectrometer (IRMS, IsoPrime GV instruments, Manchester, UK). Uptake capacity was expressed as the total amount of ^{15}N in a whole plant per gram of dry roots per hour.

B.II.3. Isotopic nitrogen analysis

N and ^{15}N contents were quantified in the different plant compartments with an elemental analyzer (EA3000, EuroVector, Milan, Italy) coupled with an isotope mass ratio spectrometer (IsoPrime IRMS, GV Instruments, Manchester, UK).

The nitrogen quantity (***NQ***) in the sample was obtained with the following formula:

$$\boldsymbol{NQ} = \frac{\%N \times MS}{100}$$

where MS represents the dry matter of the sample.

The isotopic abundance (***A%***) was determined with the formula:

$$\boldsymbol{A}\% = 100 \times \frac{^{15}N}{(^{15}N + {}^{14}N)}$$

With ^{15}N and ^{14}N representing the amount of 15 and 14 N isotopes, respectively.

The isotopic excess (***E%***) corresponds to the difference between the isotopic abundance of sample (A%) and the N natural abundance (0.3660 %):

$$\boldsymbol{E}\% = A\% - 0.3660\%$$

Finally, the isotopic excess was used to estimate the quantity of ^{15}N (µg) (***Q^{15}N***):

$$\boldsymbol{Q^{15}N} = (E\% \times QN) \times 1000$$

B.II.4. Determination of amino acid content

Ten mg of lyophilized roots were added to 400 µl of MeOH containing 0.625 nmol/µL of norvaline used as internal standard (Sigma, L'Isle d'Abeau Chesnes, France). The mix was stirred for 15 minutes and then 200 µl of chloroform and 400 µl of dd$H_2$0 were added. After centrifugation (12000 rpm, 10°C, 5 min), the supernatant was recovered, evaporated and resuspended in 100 µl of ddH_2O and then filtered on a 0.2 µm membrane before derivatization using an AccQ-Tag Ultra Derivatization Kit (Waters, Guyancourt, France) following the manufacturer's protocol (Waters, Guyancourt, France). Amino acids were separated and quantified using a UPLC/PDA H-Class system (Waters, Guyancourt, France) with a BEH C18 100x2.1mm column.

B.II.5. Extraction and quantification of soluble proteins

Two hundred mg of frozen root leaf tissue were ground in a mortar with 250 µL of citrate-phosphate buffer (20 mM citrate, 160 mM phosphate, pH 6.8 containing 50 mg of PVPP). After centrifugation (1 h, 12 000 g, 4°C), the concentration of the soluble protein extract was determined in the supernatant by protein staining (Bradford, 1976) using bovine serum albumin (BSA) as standard.

B.II.6. Western Blot of SAG12 protein

Twenty µg of soluble proteins were denatured by heating at 90 °C for 10 min in 4x Laemmli sample buffer with β-mercaptoethanol (Laemmli, 1970). Proteins were separated on an SDS-PAGE Stainfree precast gel (4-15 % acrylamide gradient; Mini-PROTEAN®, Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) and transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane as previously described by Desclos et al.

(2008). The PVDF membrane was incubated overnight in Tris buffer saline – Tween 20 (TBST; Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8, Tween 20 0.15 % (v/v)) with 3 % (v/v) skimmed milk to avoid non-specific hybridization. Immunodetection of SAG12 was performed using an anti-SAG12 specific polyclonal antibody from rabbit provided by Agrisera® (AS14 2771; 1/2000 in TBST) as primary antibody and a second antibody coupled with peroxidase (1/10000 diluted in TBST, Bio-Rad®). The quantification of SAG12 was performed by the measurement of the chemiluminescence revealed with an ECL Kit (Bio-Rad®, Marne-la-Coquette, France) using a ProXPRESS 2D proteomic imaging system (PerkinElmer, Courtaboeuf, France).

B.II.7. Proteolytic activities

Proteolytic activities of cysteine proteases were determined by *in vitro* protein degradation analysis as previously described in James et al. (2018). Twenty µg of soluble proteins were incubated in a 200 µL reaction volume containing Na-acetate buffer (50 mM, pH 5.5) and 10 µg of BSA (exogenous protein used as loading control). Cysteine protease activities (CP_{act}) were obtained by the addition of 50 µM of E-64, a cysteine protease inhibitor dissolved in dimethylsufoxide (DMSO). Furthermore, 2 mM dithiothreitol (DTT) was added to this mixture and total protease activity (TP_{act}) was obtained by substituting inhibitors with an equal volume of DMSO. Then, proteins were precipitated with 1 mL of ice-cold acetone either immediately (t_0), or after incubation for 300 min (t_{300}) at 37 °C under gentle agitation. After centrifugation (15 min, 16 000 g, 4 °C), the pellet was dissolved in 2X SDS-PAGE gel loading buffer (140 mM sodium dodecyl sulfate, 200 mM Tris, 20 % glycerol, 5 % β-mercaptoethanol, 0.3 mM Bromophenol Blue) and heated at 90 °C for 10 min. Then the soluble protein extracts were separated on a 4-15 % gradient in SDS-PAGE Stainfree precast gels (Mini-PROTEAN® TGXTM Stain Free, Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) and scanned under UV light with a Gel Doc™ EZ scanner (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). The proteolytic activities were quantified by monitoring degradation of 4 bands (95 KDa; 76 KDa; 50 KDa; 37 KDa) corresponding to endogenous proteins (EP) as targets of proteolysis at pH 5.5. Proteolytic activities are calculated as follows:

(1) Total protease activity (TP_{act} expressed in %):

$$TP_{act} = \frac{Q_{(EP)t0} - Q_{(EP)t300}}{Q_{(tot)t0}} \times 100$$

(2) Cysteine protease activity (CP_{act} expressed in %):

$$CP_{act} = \frac{[Q_{(EP)t0} - Q_{(EP)t300}] - [Q_{(EP)t0} - Q_{(EP)t300\ Inhib.}]}{Q_{(tot)t0}} \times 100$$

where the amount of EP ($Q_{(EP)}$) at t_0 and t_{300}, with (Inhib.) or without inhibitor, as well as the total amount of soluble proteins (Q_{tot}) at t_0 were quantified by using ImageLabTM software (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France).

B.II.8. Extraction and quantification of RNAs, reverse transcription and PCR analysis

Total RNAs were extracted from 200 mg of frozen leaf tissue previously ground in a mortar containing liquid nitrogen. The powder was suspended in 750 µL of extraction buffer (100 mM LiCl, 100 mM TRIS, 10 mM EDTA, 1 % SDS (w/v), pH 8) and 750 µL of hot phenol (80 °C, pH 4). After vortexing for 40 s and after addition of 750 µl of chloroform:isoamylalcohol (24/1, v/v), the homogenate was centrifuged (15 000 g, 5 min, 4 °C). The supernatant was added to 750 µl of 4 M LiCl solution (w/v) and incubated overnight at 4 °C. After centrifugation at 15 000 g for 20 min at 4 °C, the pellet containing total RNAs was resuspended with 100 µL of sterile water. Then, total RNAs were purified with an RNeasy Mini Kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen, Courtaboeuf, France). Quantification of total RNA was performed by spectrophotometry at 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq, France) before reverse transcription (RT). For RT, 1 µg of total RNAs was converted to cDNA with an iScript cDNA synthesis kit according to the manufacturer's protocol (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) before Polymerase Chain Reaction (PCR) analyses.

Sag12 and 18S rRNA gene expressions were monitored by PCR using 1 µL of cDNA added to 10 µl of a PCR mix containing 250 µM dNTPs, 0.65 µM of forward and reverse primers and 0.5 µM (5 U μL^{-1}) Qbiogene Taq polymerase (MP Biomedicals, Illkirch, France). The primers were designed with primer3+ software. *Sag12 (At5g45890)*: forward: 5'-GGCAGTGGCACACCAMCCGGTTAG-3'; reverse 5'-AGAAGCMTTCATGGCAAGACCAC-3' *and 18S rRNA (NR_141642):* forward: 5'-CGGATAACCGTAGTAATTCTAG-3'; reverse: 5'-GTACTCATTCCAATTACCAGAC-3'. PCRs were performed in a thermocycler (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) using the following program: 1 cycle at 95 °C for 5 min, 25 and 18 cycles for Sag12 and *18S rRNA* including a denaturing step at 95 °C for 30 s, a primer hybridization step at 58 °C for 45 s and an amplification step at 72 °C for 1 min. Each PCR reaction was finished with one cycle at 72 °C for 10 min. The identity of each amplicon was checked by sequencing and BLAST analysis. PCR products were separated by electrophoresis on agarose gels (1.2 % in TAE 1X with 5 µg mL^{-1} of ethidium bromide) and revealed by illumination with UV light using a Gel-Doc ™ EZ Scanner (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France).

B.II.9. Transgenic promoter*SAG12*::*UIDA* construct

The SAG12 promoter (*promoterSAG12*), containing the 1-2180 base pair sequence found in Genbank under the accession number U37336, was cloned from the pSG499 plasmid (Gan and Amasino, 1995) kindly provided by Pr. R. Amasino (University of Wisconsin-Madison, USA) into the pMDC32 vector between the PmeI and AscI restriction enzyme sites, in place of the 35S promoter, giving the pMAZ01 plasmid. The pMAZ01 plasmid was fully sequenced from the RB to the Nos terminator to verify the absence of any modification especially in the SAG12 sequence. The full-length coding sequence of *UIDA* (GUS-coding gene; from 86 to 1897 of the AJ298139 accession number) was then cloned successively in the pENTR™ vector (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), then into the pMAZ01 vector by Gateway recombination giving rise to the pMAZ02 vector containing the *promoterSAG12*::*UIDA* fusion. The correct GUS sequence was verified by sequencing.

Transgenic Arabidopsis plants carrying the *SAG12* promoter fused to the *UIDA* reporter gene were obtained by floral dipping (Clough and Bent, 1998) and 8 homozygous lines of several primary transformants were selected on the basis of their hygromycin resistance and single insertion segregation rate.

B.II.10. GUS staining and observations

Based on the method of Jefferson et al. (1987), tissues from two independent *promoterSAG12::UIDA* homozygous lines were stained overnight at 37 °C in 50 mM Na_3PO_4 pH 7.0, 5 mM ferricyanide, 5 mM ferrocyanide, 0.05 % Triton X-100 and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (1 $mg.mL^{-1}$). Then after destaining by successive incubations in 50 %, 75 %, and 96 % (v/v) ethanol, samples were kept in glycerol at 4 °C before observation.

The tissues were included in low melting point agarose (5 %; w/v) and cut with a vibratome (Microm 650v; Thermo Scientific; USA) before observation with a light microscope (AX70 Olympus, and Olympus SC30 camera, Japan) with the help of cellSens software.

B.II.11. Statistical analysis

For all parameters, at least three biological repeats were measured ($n \geq 3$). All the data are presented as the mean ± standard error (SE). To compare Col with *sag12* data, Student's t tests were performed after verifying compliance of normality with R software. Statistical significance was postulated at $p \leq 0.05$.

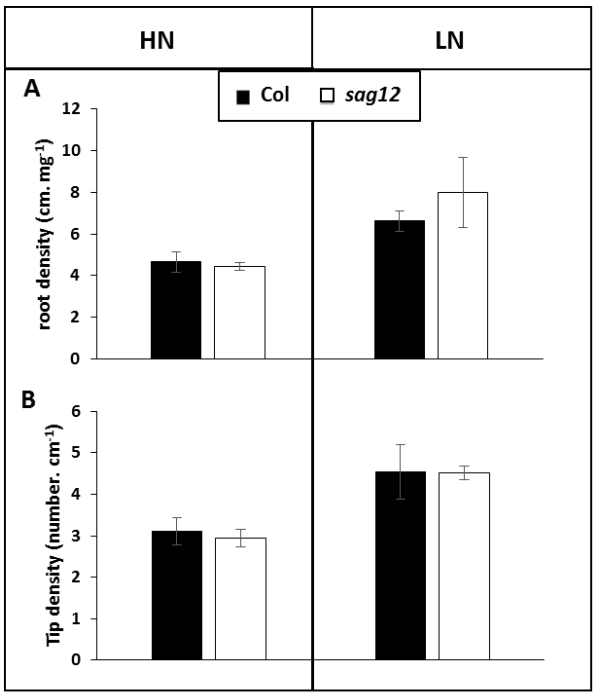


Fig. IV-B.1. Root architecture is similar in Col and *sag12*.
Root density (A) and tip density (B) of Col (black bars) and *sag12* (white bars) plants cultivated under HN and LN conditions were determined at vegetative stage (64 DAS). Results are presented as means ± SE (n=3).

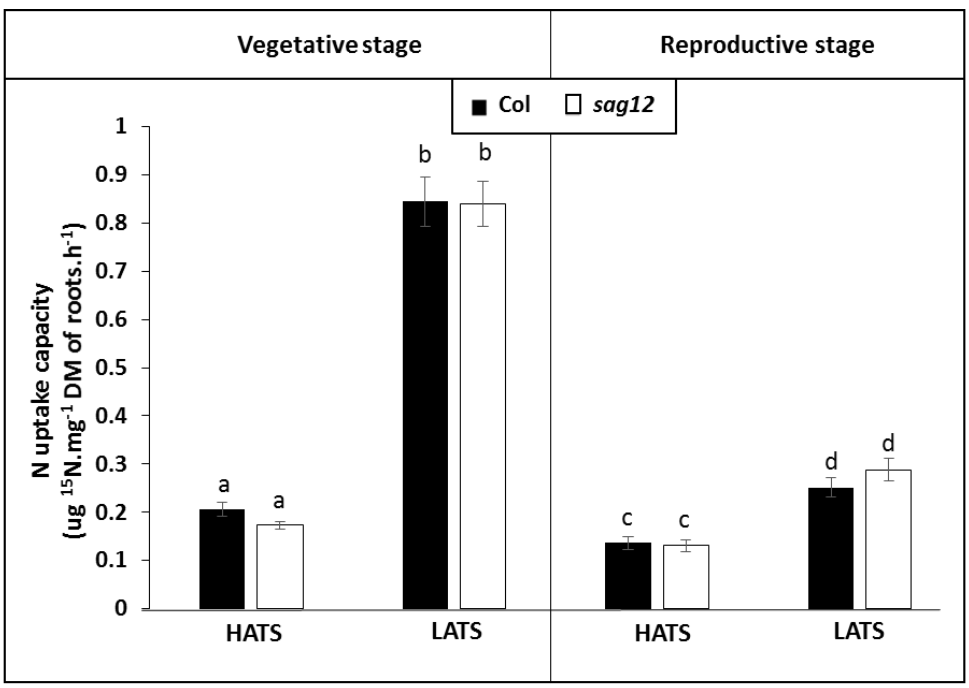


Fig. IV-B.2. Nitrogen uptake capacities by HATS and LATS are similar in Col and *sag12*.
Col (black bars) and *sag12* (white bars) plants were harvested at vegetative stage (n=12) and reproductive stage (n=8). N uptake capacities by high (HATS) and low (LATS) affinity transport systems are presented as means ± SE. Different letters indicate a statistical significant differences according to Student's t-test ($p \leq 0.05$)

B.III. Results

B.III.1. Root architecture and N uptake capacity are not affected in sag12

Irrespective of the N conditions (HN or LN), no significant differences were observed between Col and *sag12* for root (**Fig. IV-B.1A**) and root tip (**Fig. IV-B.1B**) densities. N uptake capacity was monitored by measuring the amount of ^{15}N absorbed per h and mg of root DW. In both the vegetative and reproductive stages, HATS and LATS N-uptake capacities were not different between the genotypes (**Fig. IV-B.2**). LATS uptake was higher than HATS in both the vegetative and reproductive stages. Moreover, it could be noted that the N-uptake capacity related to LATS but even more to HATS was significantly lower in the reproductive than the vegetative stage.

B.III.2. The SAG12 defect affects N allocation under LN conditions

The plants were labelled with ^{15}N for 44 DAS and then grown without ^{15}N until harvest at 125 DAS. The similar total ^{15}N amounts found in Col and *sag12* at the end of the ^{15}N labelling (not shown), confirmed the absence of differences between the genotypes in LATS and HATS uptake capacities at the vegetative stage. Plants were dissected into five compartments (roots, leaves, stems, pericarps and seeds). Under HN conditions, ^{15}N was mainly found in the leaves (Col: 31.15 % ± 1.96 % and *sag12*: 33.28 % ± 2.68 %) and in the seeds (Col: 32.22 % ± 1.46 % and *sag12*: 30.26 % ± 1.34 %) of the two genotypes (**Fig. IV-B.3**) and the partitioning of ^{15}N was not significantly different between Col and *sag12*. Under LN conditions, around 78% of the total ^{15}N of the plant was distributed in the roots, leaves and seeds in both genotypes. However, the ^{15}N partitioning was significantly different in the seeds and roots of *sag12* and Col. Partitioning of ^{15}N in the seeds of *sag12* (34.35 % ± 1.02 %) was decreased by 6.16 % compared to Col (40.51 % ± 0.64 %) and partitioning of ^{15}N in the roots of *sag12* (21.83 ± 0.45 %) was conversely increased by 2.97% compared to Col (18.85 ± 0.50 %). This then suggests a defect in ^{15}N remobilization from the roots to the seeds in *sag12*.

B.III.3. Protein content is higher in roots of sag12 cultivated under LN condition

As expected, protein and amino acid contents were higher in both genotypes when cultivated under HN compared to LN conditions (**Fig. IV-B.4**). Protein content in the roots of *sag12* and Col were similar (around 13 mg g^{-1} of DW) when plants were cultivated under HN conditions. Under LN conditions, the protein concentration was higher in the roots of *sag12* (7.87 ± 0.12 mg g^{-1}DW) than in Col (5.49 ± 0.28 mg g^{-1}DW). Interestingly irrespective of the N conditions, the amino acid contents were not significantly different between the two genotypes (**Fig. IV-B.4**).

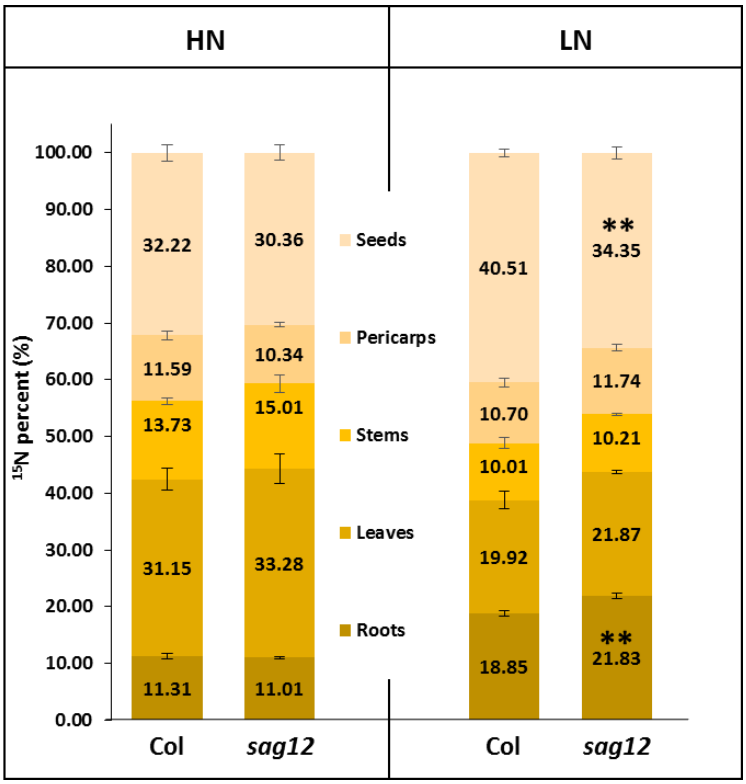


Fig. IV-B.3. N allocation in roots and seeds is affected in *sag12* under LN conditions.

Partitioning of ^{15}N in the different plant compartments (roots, leaves, stems, pericarps and seeds) was calculated from data obtained from plants harvested at seed maturity (125 DAS). Results are presented as means ± SE (n=4). Significant differences between Col and *sag12* are indicated by ** ($p \leq 0.01$; n=4).

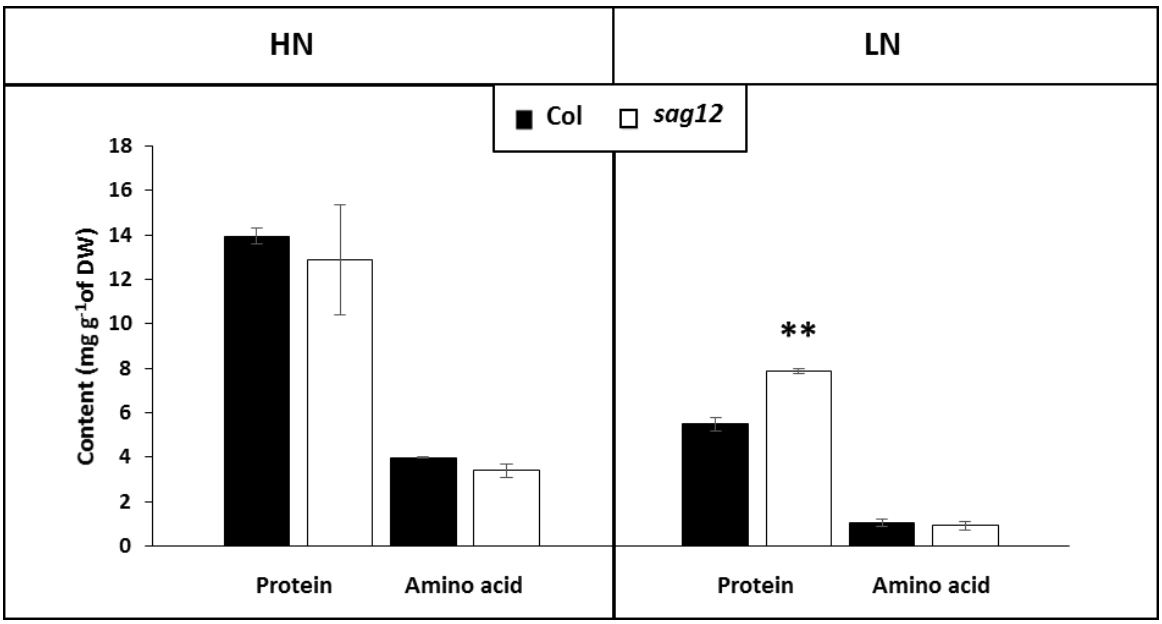


Fig. IV-B.4. Protein content is higher in roots of *sag12* at reproductive stage.

The roots of Col (black bars) and *sag12* (white bars) plants cultivated under high (HN) and low (LN) nitrogen conditions were harvested at reproductive stage (85 DAS). Values are means ± SE, n=4. Significant difference between Col and *sag12* ($p \leq 0.01$; n=4) is indicated by **.

B.III.4. SAG12 is expressed in roots at the reproductive stage and the expression is higher under low nitrogen conditions

No SAG12 transcripts (**Fig. IV-B.5A**) or protein (**Fig. IV-B.5B**) could be detected using RT-PCR and Western blots in the roots of Col at the vegetative stage under either low or high nitrogen conditions. In contrast, *SAG12* transcripts (**Fig. IV-B.5A**) and proteins (**Fig. IV-B.5B**) were detected in Col roots at the reproductive stage and under both nitrogen conditions. The amounts of SAG12 transcripts and protein were substantially higher in the roots of Col under LN conditions (**Fig. IV-B.5**). As a negative control, we verified that SAG12 protein and transcripts were undetectable in the roots of sag12, whatever the developmental stage or N conditions.

B.III.5. SAG12 is expressed in the root stele

In order to determine the location of SAG12 expression in the root tissues, GUS staining was performed on Arabidopsis plants transformed by the *promoterSAG12::UIDA* reporter fusion. Staining was performed at the reproductive stage, in which SAG12 protein was previously detected, on plants cultivated under low and high N conditions. Irrespective of the N conditions, GUS staining was observed along the entire length of the root but it was located exclusively in the stele (**Fig. IV-B.6**). Surprisingly, although the *SAG12* expression level was higher in the roots of LN cultivated plants (**Fig. IV-B.5**), we observed that GUS staining was lower in the LN cultivated roots than in the roots of plants cultivated under HN.

B.III.6. Cysteine protease activity is lower in the sag12 root under LN conditions

The total protease activity measured at the reproductive stage (at the optimum pH for SAG12 activity: pH 5.5) did not reveal any difference between Col and *sag12*, regardless of the N conditions (**Fig. IV-B.7**). Similar to the total protease activity, a strong increase in cysteine protease activity was observed when plants were cultivated under LN in comparison to HN conditions (**Fig. IV-B.7**). While no difference in cysteine protease activity was observed between genotypes when plants were cultivated under HN conditions, the defect in SAG12 led to a significant decrease in cysteine protease activity relative to Col when plants were cultivated under LN conditions (642.11 % ± 28.04 % *vs* 516.88 % ± 3.99 % in Col and *sag12*, respectively; **Fig. IV-B.7**). Such a discrepancy could be attributed to the lack of SAG12 activity.

B.IV. Discussion

In a recent study, James *et al*. (2018) have demonstrated that the absence of SAG12 in plants leads to a decrease in the production of seeds and to a lower N content in Arabidopsis seeds when cultivated

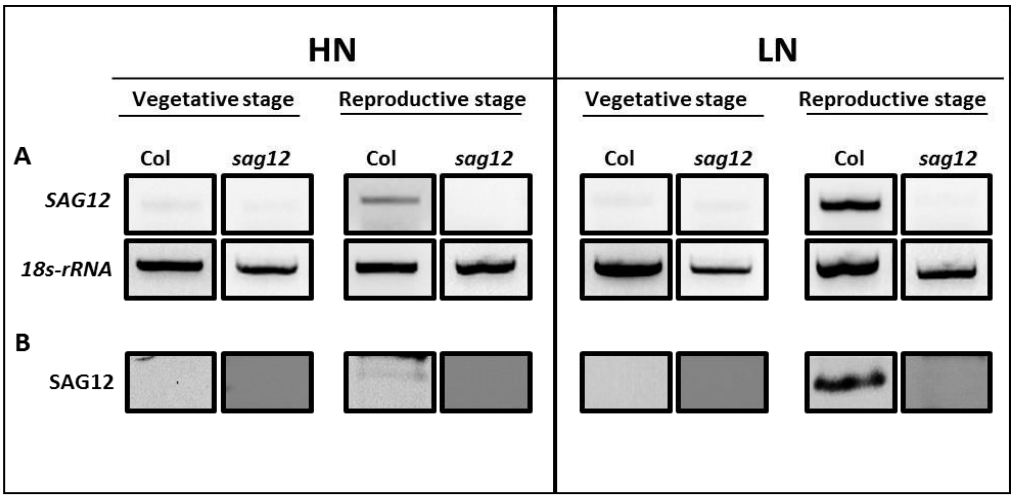


Fig. IV-B.5. SAG12 is expressed in roots only at reproductive stage especially under LN. *SAG12* and *18S-rRNA* gene expressions were monitored using RT-PCR (A). Detection of SAG12 by Western blot using an anti-SAG12 specific polyclonal antibody provided by Agrisera® (AS14 2771) (B). The ARNs and soluble proteins were extracted from roots of Col and *sag12* plants cultivated under HN and LN conditions and harvested at vegetative (64 DAS) and reproductive (85 DAS) stages.

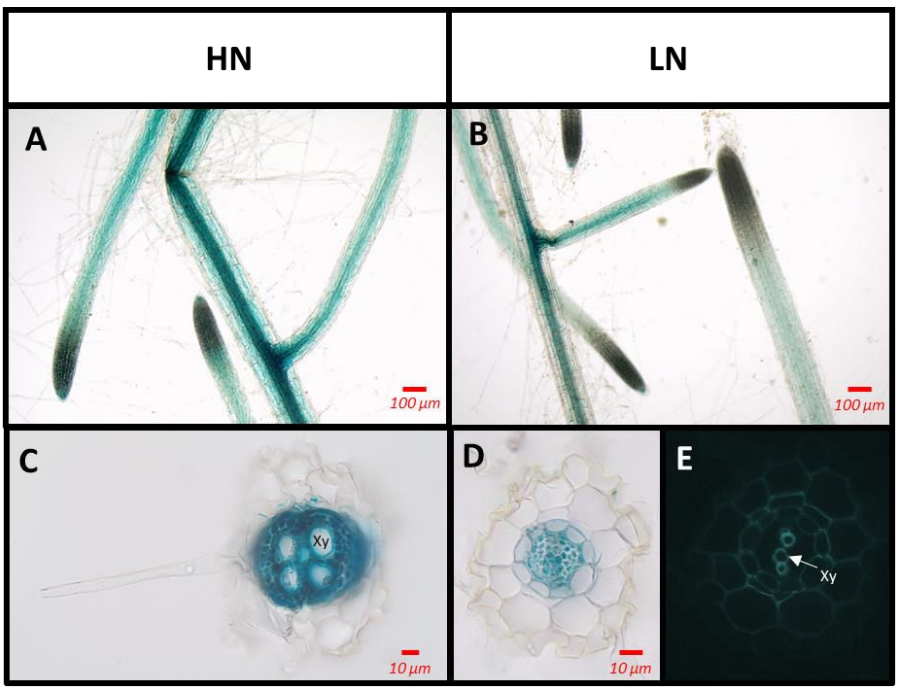


Fig. IV-B.6. *SAG12* is expressed in the root vascular tissues.
The tissues where SAG12 promoter was active were identified using the *promoterSAG12::UIDA* lines and GUS staining. Roots were observed using light microscope. Transgenic lines were cultivated under HN (A, C) and LN (B, D, E) conditions and harvested at reproductive stage. Representative pictures of the results obtained for longitudinal (A, B) and transversal (C, D) root sections are shown. Root section with UV excitation (E). Xy = Xylem tissue.

under LN conditions. The absence of such a phenotype under HN conditions was explained by the increase in cysteine and aspartate protease activities, which may compensate for the SAG12 defect and sustain N remobilization during seed filling (James *et al.*, 2018). However, although N remobilization is often considered as the major process providing N to the seeds (Tegeder and Masclaux-Daubresse, 2017), the assumption that a better N uptake in *sag12* could supplement the N allocation to the seeds, especially under low N, could not be excluded. Indeed, both NO_3^- uptake and root architecture are known to be regulated depending on the internal N status of the plant and stimulated under LN conditions (Crawford and Forde, 2002; Nacry *et al.*, 2013; Bellegarde *et al.*, 2017; Gent and Forde, 2017). We here show that whatever the N conditions (LN and HN), Col and *sag12* have the same root architecture (**Fig. IV-B.1**). In addition, no matter which developmental stage was investigated (vegetative or reproductive), the N uptake by high (HATS) and low (LATS) affinity transporters was similar in Col and *sag12* **(Fig. IV-B.2)**. Taken together, these results invalidated the hypotheses that an increase in N uptake (i) supplemented N allocation to the seeds in the *sag12* plants cultivated under HN conditions or that (ii) N content was lower in the seeds of *sag12* compared to Col when cultivated under LN condition (James *et al*., 2018). In order to monitor the N remobilization for seed filling, at the final stage of plant development (mature seed 125 DAS) we analysed the distribution of the ^{15}N provided in a pulse/chase experiment to Col and *sag12* plants cultivated under HN and LN conditions. Under HN, a similar ^{15}N distribution was observed in Col and *sag12* (**Fig. IV-B.3**), thus suggesting that SAG12 depletion did not alter N remobilisation for seed filling when nitrogen was available. These results are in good agreement with the report of James *et al*. (2018) showing that the cysteine and aspartate proteases increased in *sag12* might support N remobilization during seed filling. Interestingly, growing plants under low N conditions indicated that the proportion of ^{15}N was significantly lower in the seeds of *sag12* in comparison to Col and conversely, significantly higher in the roots of *sag12* compared to the roots of Col (**Fig. IV-B.3**). No significant difference between Col and *sag12* was found for ^{15}N partitioning in any organs other than the roots and seeds. This then revealed a defect in N remobilization from the roots to the seeds in *sag12* and strongly suggested that the low N content previously observed by James *et al*. (2018) in the seeds of *sag12* under LN condition was mainly due to the sequestration of N in its roots. Although N remobilization from the root to the seeds is poorly documented, a previous study performed in *Brassica napus* L. by Rossato *et al*. (2001) showed that more than 11 % of the N in seeds came from the remobilization of root N. Moreover, Girondé *et al.* (2015*a*) showed that *Brassica napus* genotypes with higher nitrogen remobilization efficiency had a higher contribution of N remobilised from the roots to seeds. Likewise, we observed that the protein concentration was higher in the roots of *sag12* compared to Col, when cultivated under LN, while the amino acid concentrations were

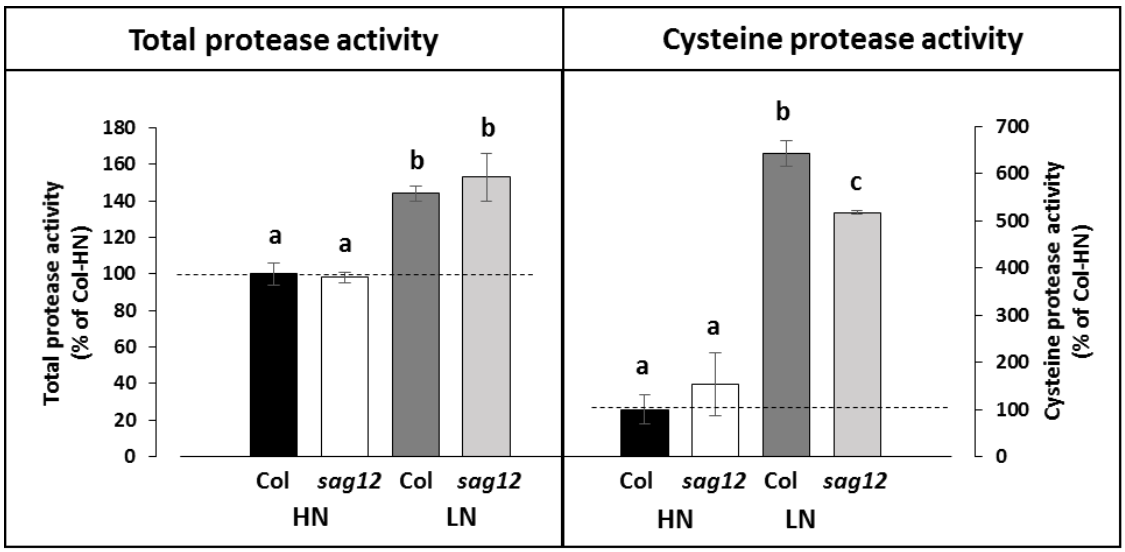


Fig. IV-B.7. Cysteine protease activity is decreased in roots of *sag12* under LN condition. Soluble proteins were extracted from roots harvested at reproductive stage (85 DAS) from Col and *sag12* plants cultivated under high (HN) or low (LN) nitrogen conditions. The cysteine and total protease activities were determined by monitoring 4 endogenous proteins degradation (95 KDa; 76 KDa; 50 KDa; 37 KDa) in the presence or the absence of the cysteine protease inhibitor E64. The protease activities are expressed as % relative to the activity in the Col roots under HN condition (100 %; dot line). Values are means ± SE, n=3. For a given protease activity (total or cysteine), significant differences ($p \leq 0.05$, n=3) are indicated by different low case letters.

unchanged (**Fig. IV-B.4**). This then emphasized the role of SAG12 protease in the proteolysis of root proteins that could serve as a nitrogen source for remobilization under low nitrogen conditions.

From this finding, we then decided to investigate whether SAG12 could be expressed in the root tissue, at least under LN conditions, which has never been described before. Indeed, although the expression of SAG12 in leaves during natural and induced senescence was clearly demonstrated by numerous studies performed in various plant species (Lohman *et al.*, 1994; Gan and Amasino, 1997; Desclos *et al.*, 2009; Parrott *et al.*, 2010; Carrión *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2013; Poret *et al.*, 2016; Curci *et al.*, 2017), to our knowledge there was no evidence for SAG12 expression in plant root tissue. In the present work the SAG12 transcripts and proteins were detected in the roots of *Arabidopsis thaliana* at the reproductive stage, but not at the vegetative stage. In addition, SAG12 expression and protein levels were much higher in roots of plants cultivated under LN than under HN conditions (**Fig. IV-B.5**). This makes sense because sink strength is known to be stronger at the reproductive stage due to the maturation of seeds and also stronger under LN conditions. The GUS staining of *promoterSAG12::UIDA* lines at the reproductive stage confirmed that SAG12 was expressed in the root and especially localized in the stele (**Fig. IV-B.6**). We noticed that despite higher *SAG12* expression in roots under LN than under HN, GUS staining was weaker in roots of LN plants. This was possibly due to the fact that the stronger protease activity measured under LN may have led to degradation of the β-glucuronidase enzyme, as previously shown in senescent leaf tissues by Noh and Amasino, (1999b). Taken together, the expression of *SAG12* in roots, and the increase in total protein content in the roots of *sag12* suggests that SAG12 is involved in the proteolysis associated with the root N remobilization, particularly when plants are facing N limitation.

This assumption was verified by measuring the total- and cysteine-protease activities in the roots of Col and *sag12* at the reproductive stage. While the depletion of SAG12 did not affect the total protease activity in roots, it impacted significantly on the cysteine protease activity of the roots of plants cultivated under LN conditions. Altogether, the results show that the SAG12 protease plays a major role in the breakdown of root proteins when plants are facing N limitation and is required for efficient N remobilization to the seeds.

B.V. Conclusion

This study shows for the first time the role of SAG12 in the roots for N remobilization to support seed production and seed N content under N limitation. The results obtained in this study are important for improving N use efficiency in crops. For example, in *Brassica napus*, the level of SAG12 root expression

could have partly explained the contrasting N use efficiency highlighted by Girondé *et al.*, (2015*a*,*b*) in different genotypes cultivated under N limiting conditions.

Acknowledgments:

The authors would like to thank Dr. Nathalie Nési (UMR 1349 Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, INRA, Agrocampus Ouest, Université de Rennes) and Pr. Jean-Christophe Avice (UMR INRA–UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions N.C.S., Université de Caen Normandie) for the management of the RAPSODYN ANR program. We are most grateful to the PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) core facility for elemental analysis, to the "Centre Mondial de l'Innovation" (Groupe Roullier) for amino acid analysis and to Dr. Laurence Cantrill for proofreading and English correction. 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.

C. Etude du rôle des protéases à cystéine dans l'élaboration du rendement chez le colza (*Brassica napus* .L)

Résultats préliminaires

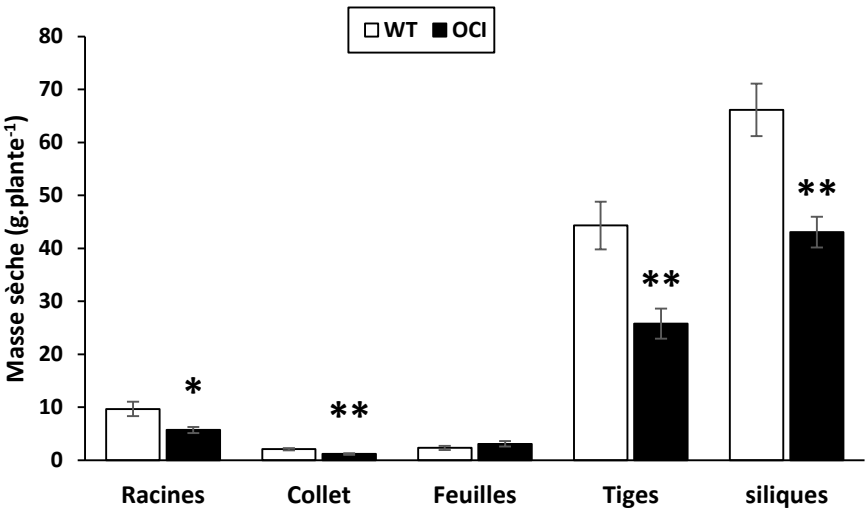


Fig. IV-C.1. Les biomasses de tous les organes des colzas sur-expresseurs d'une cystatine de riz (OCI) exceptés les feuilles sont inférieures à celles du sauvage (WT).

La masse sèche des différents organes (racines, collet, feuilles, tiges, siliques) a été mesurée après 183 jours de culture sous condition de forte alimentation en N, peu de temps avant que les graines n'arrivent à maturité. Les valeurs représentent les moyennes ± SE pour n=8. Les différences significatives pour $p<0,05$ et $p<0,01$ sont indiquées respectivement par * et **.

Les précédents travaux (*cf.* chapitres IV-A et IV-B) ont mis en avant le rôle de la protéase à cystéine SAG12 dans la remobilisation de l'azote foliaire et racinaire essentiel au remplissage des graines chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana,* une Brassicacae. Ces résultats soulèvent de manière plus générale la question du rôle des CPs dans l'élaboration du rendement chez une plante de grande culture telle que le colza. Pour répondre à cette question, la stratégie adoptée a consisté à inhiber l'activité de l'ensemble de la classe des CPs afin de vérifier les conséquences sur le rendement. Le matériel génétique permettant la réalisation de cette étude était d'ores et déjà disponible. En effet, un colza de printemps (*Brassica napus* L. cv. *Drakkar*) sur-exprimant un inhibiteur des CPs (une cystatine du riz (OCI)) sous le contrôle d'un promoteur *35S*, a été développé par l'équipe de Rahbé *et al.*, (2003) dans le cadre d'une étude focalisée sur la réponse des plantes aux stress biotiques. Ce matériel est particulièrement intéressant puisqu'il permet d'exprimer un inhibiteur des activités de toutes les CPs de manière constitutive et ectopique, notamment dans les feuilles en sénescence, qui constituent à la fois l'organe source d'azote majoritaire (Rossato *et al.*, 2001; Girondé *et al.*, 2015*a*) et l'organe où les CPs sont le plus induites. Nous disposions seulement de quelques graines que nous avons utilisées pour réaliser une culture en collaboration avec l'Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB) afin de multiplier ce matériel génétique (OCI). Néanmoins, nous avons profité de cette culture pour réaliser une expérimentation préliminaire permettant un premier phénotypage à différents stades de développement, essentiellement en se focalisant sur la production de biomasse.

Pour cela, des colzas OCI et du cultivar Drakkar (le fond génétique ayant servi à la construction des sur-expresseurs OCI) ont été cultivés en condition de forte disponibilité en N (3,75 mM d'N). Une période de vernalisation de 45 jours a été appliquée après 31 jours de semis afin d'initier et de synchroniser la montaison des plantes. La récolte a été effectuée lorsque les graines arrivaient à maturité (183 jours après semis).

L'analyse de la biomasse sèche des différents organes montre, qu'à l'exception des feuilles, une baisse significative (environ 60 %) de la biomasse de tous les organes chez les plantes sur-exprimant la cystatine par rapport au colza de type sauvage (**Fig IV-C.1**). A titre d'exemple, une chute drastique (-65 %) de la biomasse des siliques est observable chez les OCI comparés au sauvage. Ce résultat renforce l'hypothèse que les CPs joueraient un rôle majeur dans l'élaboration du rendement en graines.

Malgré cette forte diminution de la production de siliques, la teneur en azote dans ce compartiment est supérieure chez les plantes OCI (3,68 ± 0,08 % de la masse sèche) comparée au sauvage

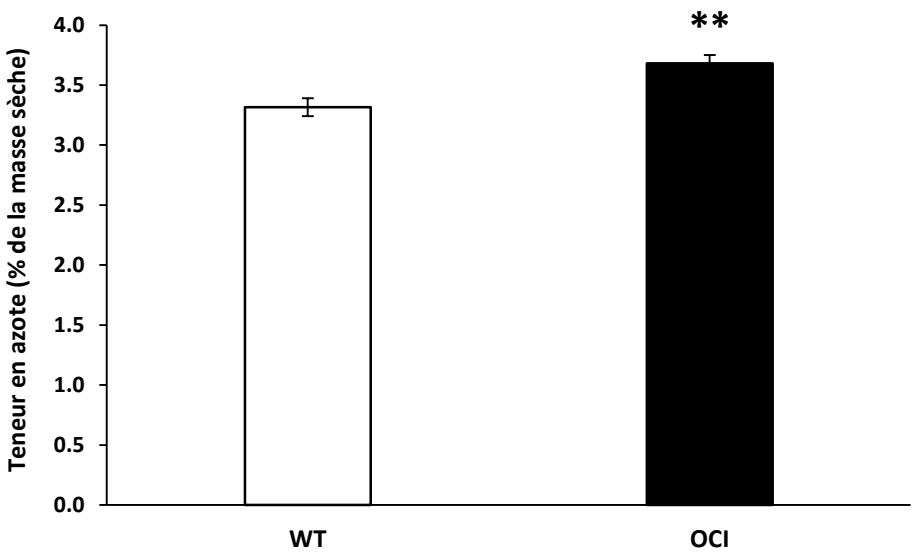


Fig. IV-C.2. La teneur en azote des siliques des colza sur-expresseurs d'une cystatine de riz (OCI) est supérieure à celle du sauvage (WT).
La teneur en N des siliques a été mesurée après 183 jours de culture sous condition de forte alimentation en N, peu de temps avant que les graines n'arrivent à maturité. Les valeurs représentent les moyennes ± SE pour n=8. Les différences significatives pour $p<0,01$ sont indiquées par **.

(3,32 ± 0.07 % de la masse sèche) (**Fig IV-C.2**). Ce résultat suggère que les colzas OCI sont capables de solliciter des systèmes protéolytiques pour compenser l'inhibition de l'activité des protéases à cystéine consécutive à la surexpression de la cystatine de riz afin d'assurer la remobilisation de l'N et *in fine* un remplissage correcte en N des graines. Afin de valider cette hypothèse, il conviendra de réaliser une analyse des activités des différentes classes de protéases. Ceci permettra d'une part, de confirmer l'inhibition de l'activité des protéases à cystéine par la surexpression de la cystatine de riz et d'autre part, de permettre l'identification d'activités protéasiques impliquées dans la compensation de cette inhibition.

D. Overexpression of a *Brassica napus* L. Water Soluble Chlorophyll binding Protein (WSCP1) to delay dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*

En cours de rédaction

Contexte : L'activité protéolytique en lien avec la sénescence est pilotée par de nombreuses protéases dont l'activité est en partie contrôlée par des inhibiteurs naturels. Parmi ces inhibiteurs, les « Water Soluble Chlorophylle Binding Proteins » (WSCPs) présentent l'avantage de pouvoir posséder une double fonction d'inhibition de protéases mais aussi de protection des chlorophylles. Cette double fonction en fait des candidats particulièrement pertinents pour retarder la progression de la sénescence foliaire afin d'allonger la durée de vie des feuilles et ainsi réduire l'asynchronisme entre la période de vidage de ces organes sources et la période de remplissage des graines. Des études réalisées chez le colza ont permis d'identifier au moins 2 WSCPs (BnD22 et WSCP1) présentant potentiellement cette double fonction et induites dans les jeunes feuilles par un traitement au Méthyl Jasmonate (Desclos *et al.*, 2009). Alors que le rôle de BnD22 dans la modulation de la progression de la sénescence foliaire est relativement bien établi (Reviron *et al.*, 1992 ; Schmit *et al.*, 1993 ; Etienne et al. 2007), celui de WSCP1 reste à ce jour inconnu.

Objectif : Démontrer la capacité de WSCP1 à moduler la progression de la sénescence foliaire.

Méthode : Pour réaliser cette étude des lignées d'*Arabidospis thaliana* caractérisée par une sénescence foliaire précoce (RIL232 ; Loudet *et al.*, 2002) ont été transformées afin d'exprimer la protéine WSCP1 sous le contrôle du promoteur *SAG12* (*pSAG12*::*WSCP1*). La sénescence a été initiée par un maintien des feuilles matures à l'obscurité puis des mesures de chlorophylles, de protéines et d'activité de protéases ont été réalisées afin de suivre la progression de la sénescence chez les lignées *pSAG12*::*WSCP1 c*omparativement au fond génétique *RIL232*. De plus, une étude de la localisation subcellulaire de WSCP1 a été entreprise par microscopie.

Résultats : Un maintien des chlorophylles est observé dans les feuilles matures ombrées des lignées *pSAG12*::*WSCP1* comparativement à celles des *RIL232* et laisse supposer que la surexpression de WSCP1 conduit à un ralentissement de la progression de la sénescence. La fonction de protection des chlorophylles que cela laisse supposer pour WSCP1 est cohérente avec la localisation chloroplastique mise en évidence par microscopie. Par ailleurs, alors qu'aucune différence d'activité protéasique globale n'est observée, une diminution significative de l'activité sérine protéase, la classe de protéase cible des WSCPs, a été observée dans les feuilles matures de *pSAG12*::*WSCP1* comparées à celles de RIL232.

Conclusion : Au vu de ces résultats, il semble que la protéine WSCP1 puisse être réellement dotée de la double fonction de protection de chlorophylles et d'inhibition de protéases à sérine. De ce fait, la protéine WSCP1 est vraisemblablement un candidat intéressant pour retarder la progression de la sénescence et ainsi, en prolongeant la durée de vie des feuilles, améliorer l'EUA.

Title: Overexpression of a *Brassica napus* L. Water Soluble Chlorophyll binding Protein (WSCP1) to delay dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*

Maxence James[1*], Alexandra Girondé[1], Anne Marmagne[2], Didier Goux[3], Jacques Trouverie[1#], Philippe Etienne[1#],

[#] Authors with equal contribution
[1] Normandie Université, UNICAEN, INRA, UMR 950 EVA, SFR Normandie Végétal (FED4277), 14000 Caen, France
[2] Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay, 78000, Versailles, France
[3] Normandie Université, CMABIO[3], SF 4206 ICORE, 14000 Caen, France

In writting

Abstract:

In *Brassica napus* L., one of the levers for improving the Nitrogen Remobilization Efficiency (NRE) of rapeseed is to delay senescence in order to prolong the lifespan of the leaves, allowing to reduce the asynchronism between the emptying period of these organs sources and the period of seed filling. The Water Soluble Chlorophyll Binding Proteins (WSCPs), proteins known to be able to have a putative dual function of chlorophylls protection and inhibiting proteases, make them excellent candidates to delay senescence. Several isoforms of WSCPs have been already identified in leaves of rapeseed and among them, the WSCP1 protein has in its amino acid sequence several characteristic motifs of both functions. In order to test *in vivo* the ability of the WSCP1 protein to delay senescence, an overexpression of the WSCP1 protein under the control of the SAG12 promoter (*promoterSAG12*::*WSCP1*) was developed from an *Arabidopsis thaliana* line previously described as being early senescent (RIL232). During dark-induced senescence of leaves, overexpression of WSCP1 leads to a delay in chlorophyll degradation and an inhibition of serine proteases compared to RIL232. Despite the serine proteases inhibition, the protein content in leaves remained similar between both genotypes suggesting the recruitment of proteolytic compensatory systems. The immunodetection of WSCP1 in leaves of *pSAG12*::*WSCP1* lines allowed for the first time to locate a WSCP isoform in chloroplasts. Altogether, these results confirm the interest of WSCP1 for delaying senescence.

Keywords: Chlorophyll, Leaf senescence, Protease inhibitor, Serine protéase, WSCP1

Running title: WSCP1 delay leaf senescence

D.I. Introduction

Senescence corresponds to the final stage of development of plants, organs or cells, which leads to death. This process is characterized by the degradation of macromolecules, allowing the remobilization of various elements such as carbon and nitrogen from senescent organs towards growing organs during sequential senescence or seeds during monocarpic senescence (Gregersen *et al.*, 2013; Avice and Etienne, 2014). However, some studies performed in agronomic crops such as *Brassica napu*s L., shown that the nutrient remobilization efficiency is very contrasted during these both types of senescence. As an example, in *Brassica napus*, if the monocarpic senescence is considered as particularly efficient and lead to low residual N content in fallen leaves (around 1 % of the DW), sequential senescence lead to high content in fallen leaf (2.5 to 4 % of the DW). Consequently, it is commonly accepted that enhance of the efficiency of the sequential senescence could be a lever to improve the agro-environmental statement of this crop. Many studies have shown that a delay in leaf senescence lead to an improvement of the yield in many species (Thomas and Stoddart, 1980; Thomas and Smart, 1993; Hunková *et al.*, 2011; Gregersen *et al.*, 2013). As example, Malagoli *et al*. (2005a; 2005b) have demonstrated that an increase of the leaf life span, leading to a better synchronism between the N remobilization from this source organ and the seed filling, would allow an increase of the yield by around 30%. This assumption is supported by other works showing that "stay-green" lines of pea (*i.e.* lines with a delay of the initiation or progression of leaf senescence) have a better growth (Kusaba *et al.*, 2013).

Different ways can been used to delay leaf senescence. One of them consists to promote the cytokinine biosynthesis in plants overexpressing the isopentenyl transferase gene (IPT; encoding enzyme involved in cytokinin synthesis) thanks to a senescence specific promoter (*promoteurSAG12*). In these plants, a delay of leaf senescence associated with an increase of the duration of leaf photosynthetic activity as well as an increase of biomass were observed (Gan and Amasino 1995 ; 1997). Another interesting way consists to delay the proteases activities involved in N remobilization during leaf senescence using endogenous plant protease inhibitors such as cystatin. Cystatins are natural and endogenous compounds, which inhibit cysteine proteases, one of the protease classes the most strongly induced during leaf senescence. As an example, the overexpression of a rice cystatin gene (oryzacysttin-1; *OsOC-1*) in tobacco lead to an increase of leaf protein content (and especially an increase of the abundance of two RuBisCO activase isoforms) associated with a delay leaf senescence (Prins *et al.*, 2008). Another endogenous protein family, the "Water Soluble Chlorophyll binding Proteins" (WSCPs) can have also a protease inhibitor function in addition to their chlorophyll binding ability. Indeed, many WSCPs (Schmidt *et al.*, 2003;

Horigome *et al.*, 2007; Damaraju *et al.*, 2011) are able to bind chlorophyll and allow the photo-protection of chlorophylls reducing the reactive oxygen species related to chlorophyll degradation (Schmidt *et al.*, 2003). Some WSCPS, such as BnD22 characterized in *Brassica napus,* due to the presence of a Künitz motif ([LIVM]-x-D-x-[EDNTY]-[DG]-[RKHDENQ]-x-[LIVM]-x(5)-Y-x-[LIVM]) (REF $) are also able to inhibit cysteine but especially serine proteases (Reviron *et al.*, 1992; Desclos *et al.*, 2008; Rustgi *et al.*, 2017*b*). However, if many works study the role of these plant protease inhibitors during the plant response to abiotic and biotic stresses (Schmidt *et al.*, 2003; Etienne *et al.*, 2007; Desclos *et al.*, 2008; Damaraju *et al.*, 2011; Boex-Fontvieille *et al.*, 2015), very few focused on the putative role of theses protease inhibitor during leaf senescence. One of these studies, performed in *Brassica napus*, have allowed to identify 2 WSCP isoforms with a kunitz motif (BnD22 and WSCP1) in young leaves of plants sprayed with methyl jasmonate. Authors suggest that these both WSCPs, because of their putative dual function, could play a role in the regulation of the progression of leaf senescence (Desclos *et al.*, 2008). In contrast to BnD22 for which there is some evidences of its implication in the progression of the leaf senescence (Etienne *et al.,* 2007; Desclos *et al.,* 2008), the role of WSCP1 in this process remain unknown.

Account taken of WSCP1 characteristics, i.e. expression in young leaves until the onset of leaf senescence and its putative dual function, this protein could be relevant to extend the life span of leaves and thus to reduce the asynchronism between the remobilization of N from leaves and the requirements of N of seeds during filling stage.

In this context, the aim of this study was to ascertain if an overexpression of WSCP1 during the senescence is able to extend the life span of leaves. To reach this goal *Arabidopsis thaliana* lines (RIL232, Loudet *et al.*, 2002) characterized by an early leaf senescence phenotype, were transformed with *WSCP1* gene under the control of the specific senescence SAG12 promoter (p*SAG12*::*WSCP1*). Leaf senescence was initiated by dark and measurements of chlorophyll, protein and protease activity were undertaken to monitor the progression of leaf senescence in pSAG12::WSCP1 lines compared to the genetic background RIL232.

D.II. Material and methods

D.II.1. Plant material

The SAG12 promoter, containing the 1-2180 base pair sequence found in Genebank under the accession number U37336 was cloned from the pSG499 plasmid (Gan and Amasino, 1995) kindly provided by Pr. R. Amasino (University of Wisconsin-Madison, USA) into the pMDC32 vector between the PmeI and

AscI restriction enzyme sites, in place of the 35S promoter, giving the pMAZ01 plasmid. The pMAZ01 plasmid was fully sequenced from the RB to the Nos terminator to verify the absence of any modification especially in the *promoterSAG12* sequence. The full-length coding sequence of *WSCP1* (657 pb; accession number AB012699) was amplified by PCR from *Brassica napus* (Var. capitol) leaf cDNA library with specific primers (forward: 5'- ATGAAGACTTTTTTTCTAGTTACTCTC - 3' ; reverse 5'- CTAGTAGAATGGGAACATCTTTAGACC -3') and cloned successively in the TOPO® vector (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), then into the pMAZ01 vector by Gateway recombination giving rise to the pMAZ02 vector containing the *promoterSAG12*::*WSCP1* fusion. Correct WSCP1 sequence was checked by sequencing. Transgenic plants carrying the *SAG12* promoter fused to the *WSCP1* gene were obtained by floral dipping (Clough and Bent, 1998) of *Arabidopsis* lines (RIL232; Loudet *et al.*, 2002) selected for their early leaf senescence phenotype. Two homozygous lines (p*SAG12*::*WSCP1* #5 and #6) from several primary transformants were selected based on their hygromycine resistance and single insertion segregation rate.

D.II.2. Plant growth conditions

Seeds (RIL232; p*SAG12*::*WSCP1* #5 and #6) were stratified for 48 h in 0.1 % agar (Select agar, Sigma, L'Isle d'Abeau Chesnes, France) at 4 °C in the dark and then sown onto lids cut from Eppendorf tubes (0.5 ml) and filled with 0.8 % agar. Plants of each genotype were placed in a glasshouse on a tank containing 10L of nutrient solution with 3.75 mM NO_3^- (1.25 mM $Ca(NO_3)_2.4H_2O$; 1.25 mM KNO_3; 0.5 mM $MgSO_4$; 0.25 mM KH_2PO_4; 0.2 mM EDTA.NaFe.$3H_2O$; 14µM H_3BO_3; 5 µM $MnSO_4$; 3 µM $ZnSO_4$; 0.7 µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$; 0.7 µM $CuSO_4$; 0.1 µM $CoCl_2$) renewed every week during 76 days. Photosynthetic photon flux density was 110 mmol m^{-2} s^{-1}, day/night temperatures were 21°C/18°C and photoperiod was 8h light /16 h dark.

The three leaves with the highest SPAD value (Soil Plant Analysis Development; Minolta, SPAD-502 model) were considered as mature leaves. The senescence of these three mature leaves has been induces by covering. Every two days from the dark induction of senescence (D0) until the leaf abscission (D14), the chlorophyll content was estimated with SPAD device. In addition, the three mature leaves were harvested and pooled at D0 and 6 days after dark treatment (D6) and frozen at -80°C for further analyses.

D.II.3. Extraction and quantification of soluble proteins

The extraction of soluble proteins was realized from 200 mg of frozen fresh mature leaf tissue ground in a mortar with 500 µL citrate-phosphate buffer (20 mM citrate, 160 mM phosphate, pH 6.8 containing 50 mg of PVPP). After centrifugation (1 h, 12 000 g, 4°C), the concentration of the soluble

protein extract was determined in the supernatant by protein staining (Bradford, 1976) using bovine serum albumin (BSA) as standard.

D.II.4. Detection of the WSCP1 protein by Western Blot

To perform the detection of WSCP1 protein, 20 µg of soluble proteins previously extracted were denatured by heating at 90 °C for 10 min in Laemmli 4x sample buffer with β-mercaptoethanol (Laemmli, 1970). Proteins were separated on a SDS-PAGE precast Stainfree gel (4-15 % acrylamide gradient; Mini-PROTEAN®, Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) and transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane as described previously by Desclos *et al.* (2008). The PVDF membrane was incubated overnight in Tris buffer saline – Tween 20 (TBST; Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8, Tween 20 0.15 % (v/v)) with 3 % (v/v) skimmed milk to avoid non-specific hybridization. Immunodetection of WSCP1 was performed using specific polyclonal antibody from rabbit produced by Eurogentec® (1/2000 diluted in TBST) as primary antibody and a second antibody coupled with peroxidase (1/10000 diluted in TBST, Bio-Rad®). Chemiluminescence (ECL kit, Bio-Rad®) was measured by using a ProXPRESS 2D proteomic Imaging System (PerkinElmer, Courtaboeuf, France).

D.II.5. Profiling of the active serine proteases

Active serine proteases labelling and detection have been performed using a serine protease specific fluorescent probe (FP-Rh) according to Poret *et al.* (2016). Briefly, protease labelling was performed with 20 µg of soluble protein extracted from mature leaves harvested at D6, in a 200 µL reaction volume containing tris buffer (50 mM, pH 7.5). Mixture was kept 30 min at room temperature before addition of 1 µL of FP-Rh (1mM in DMSO) or 1 µL of DMSO for control without probe (No Probe Control: NPC). After incubation (1 h in dark) under gentle agitation at room temperature, protein were precipitated by addition of 1 mL of ice-cold acetone. After centrifugation (15 min, 16 000 g, 4 °C), the pellet was resuspended in 40 µl 2X SDS-PAGE gel-loading buffer (140 mM SDS; 200 mM Tris; 20% glycerol; 5% β-mercaptoethanol; 0.3 mM Bromophenol Blue), then proteins were denatured by heating at 90 °C for 10 min before separation on 12 % SDS-PAGE. The fluorescence of labelled proteins was visualized by a scan coupled with ProXPRESS 2D proteomic Imaging System (PerkinElmer) with excitation and emission wavelengths at 540 and 590 nm, respectively. The fluorescence signal intensity was quantified by gel analysis tool of ImageJ software (Schneider *et al.*, 2012).

```
          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   10        20        30        40        50        60        70
BnD22     MKTFFLVTLL LAAAVCTHGR EQVKDSNGNP VKRGAKYFIQ PAKSNAGGLV PAAINLLPFC PLGITQTLLP
WSCP1     MKTFFLVTLL LAAAVCTHGR EQVKDSNGNP VKRGAKYFIQ PAKSNGGGLF PAAINILPFC PLGITQTLLP

          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   80        90       100       110       120       130       140
BnD22     YQPGLPVSFG YEPVIVGTDY IYTSTTINIE FESDIWPVCN ELSKLWAVDV SSSAAKEPAI IIGGESTAPN
WSCP1     YQPGLPVSFG YEPVIVGTDY IYTSTTINIE FRSEIWPGCN ELSKLWAVDV SSTAAKEPAI IIGGERTAPN

          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                  150       160       170       180       190       200       210
BnD22     SLFKIEEATE ANTYKLTTSY GTVGTIPGPW LSAPQLIVTN DESKTLFVKF VKVDDAATKA TTSTSRVEKL
WSCP1     SLFKIEEATG AHTYKLTTSS GTVGTIPGPW LGAPQLIATN DDAKTLFVKF VKVDDDATKA TTSTSRVEKL

          ....|...

BnD22     GLKMFPFY
WSCP1     GLRMFPFY
```

Fig. IV-D.1. Alignment of amino acid sequences of BnD22 and WSCP1 showing different motifs supporting the putative dual function.
Amino acid residues that are not identical to those of BnD22 are highlighted in blue. Amino acid sequence of the motif characteristic of the künitz-type protease inhibitors was framed in red (Nishio and Satoh, 1997). The 4 amino acids framed in green are suspected to be responsible for the fixation to chlorophyll (Horigome *et al.,* 2007). Amino acid sequence of chlorophyll binding motif conserved between all WSCPs was framed in yellow (Satoh *et al*., 2001). Asterisks in blue indicate predicted sites for N and C signal peptide cleavages.

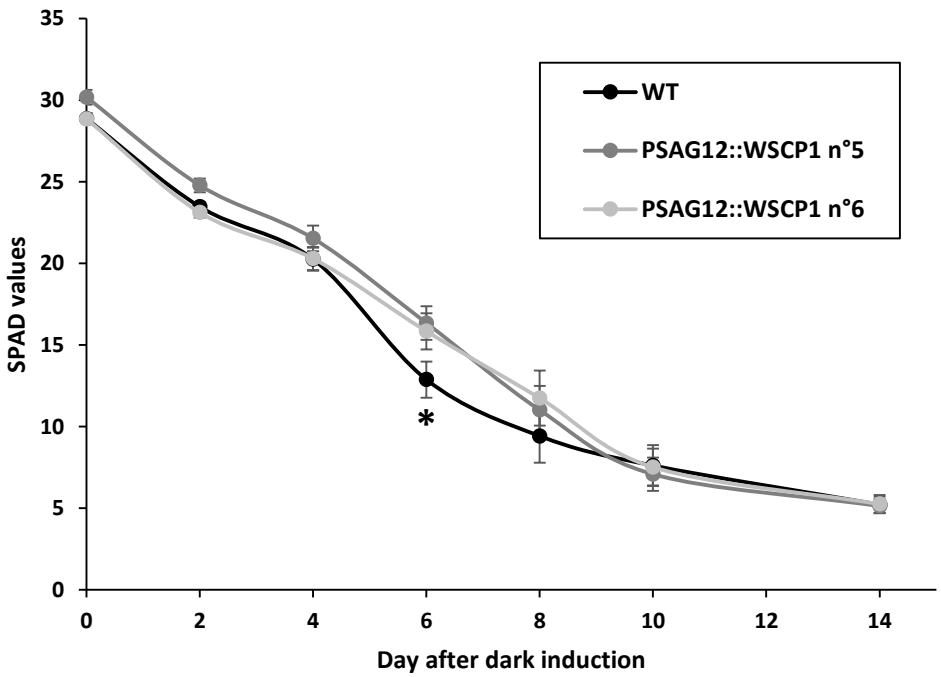


Fig. IV-D.2. Kinetics of chlorophyll content in leaves of RIL232 and overexpressor lines (p*SAG12*::*WSCP1* #5 and #6) during dark-induced senescence progression.
Values are means ± SE for n=21 up to 6 days and n=11 after. Significant difference between genotype (p≤0.05) is indicated by *.

D.II.6. Immunolocalization of WSCP1 protein

Mature leaves were cut with a punching tool and sections were kept overnight under vacuum into a fixative solution (4 % paraformaldehyde; 0.1 % Glutaraldehyde in cacodylate of sodium buffer 0.1 M, pH 7) at 4 °C. The next day, sections were dehydrated with several baths in different ethanol solutions (70, 95 and 100 % v/v). Afterwards, sections were impregnated using successive baths (1.5 h each) of LR white resin (Thermo Fisher scientific, Newman, 1987) in ethanol (25, 50, 75 % v/v) followed by a last LR white resin (100 %) bath overnight. The following day, two LR white resin (100 %) baths (1 h then 3 h) were applied to the sections before transfer in a new LR-White resin (100%) and polymerization during 24 h at 50 °C in capsules. Then, the resin blocks containing mature leaf sections were cut with an ultramicrotome (Leica Ultracut R) and resulting sections were immunostained. For this, blocking of non-specific sites was carried out with 3 % PBS-BSA at room temperature during 30 min. Sections were then incubated overnight with a rabbit primary antibody anti-WSCP1 provided by Eurogentec® (1/1000 in 1 % PBS-BSA). A second incubation with goat secondary antibody anti-rabbit, labelled with Alexa Fluor 488 (1/500 in 1% PBS-BSA, Thermo Fisher Scientific, USA) was performed during 2 h in darkness. A drop of Fluoromount mounting medium (Thermo Fisher Scientific, USA) was added before observation under a confocal microscope (Olympus FV 1000).

D.III. Results

D.III.1. WSCP1 have the putative chlorophyll binding and protease inhibitor dual function.

BnD22 being the only WSCP functionally characterized in *Brassica napus*, an alignment of the amino acids sequences of WSCP1 and Bnd22 was performed to highlight similarity and motifs associated with putative chlorophyll binding and serine protease inhibitor functions (**Fig. IV-D.1**). Alignment of the 218 amino acids show a 96 %similarity. Both sequences have the same predicted cleavage sites for N- and –C terminal signal peptide with a length of 19 and 21 amino acids, respectively. Analyses of WSCP1 amino acids sequence reveal a künitz motif ([LIVM]-x-D-x-[EDNTY]-[DG]-[RKHDENQ]-x-[LIVM]-x(5)-Y-x-[LIVM]) found at the same location as BND22 suggesting a putative serine protease inhibitor function. In addition, 4 specific amino acid (Proline 5, glutamine 72, and tryptophan 106 and 170) known to be related to the chlorophyll binding function is found in the sequence of WSCP1 as in that of Bnd22. Moreover, a chlorophyll binding motif conserved between all WSCP (57-PFCPLGI-65) was found also in WSCP1.

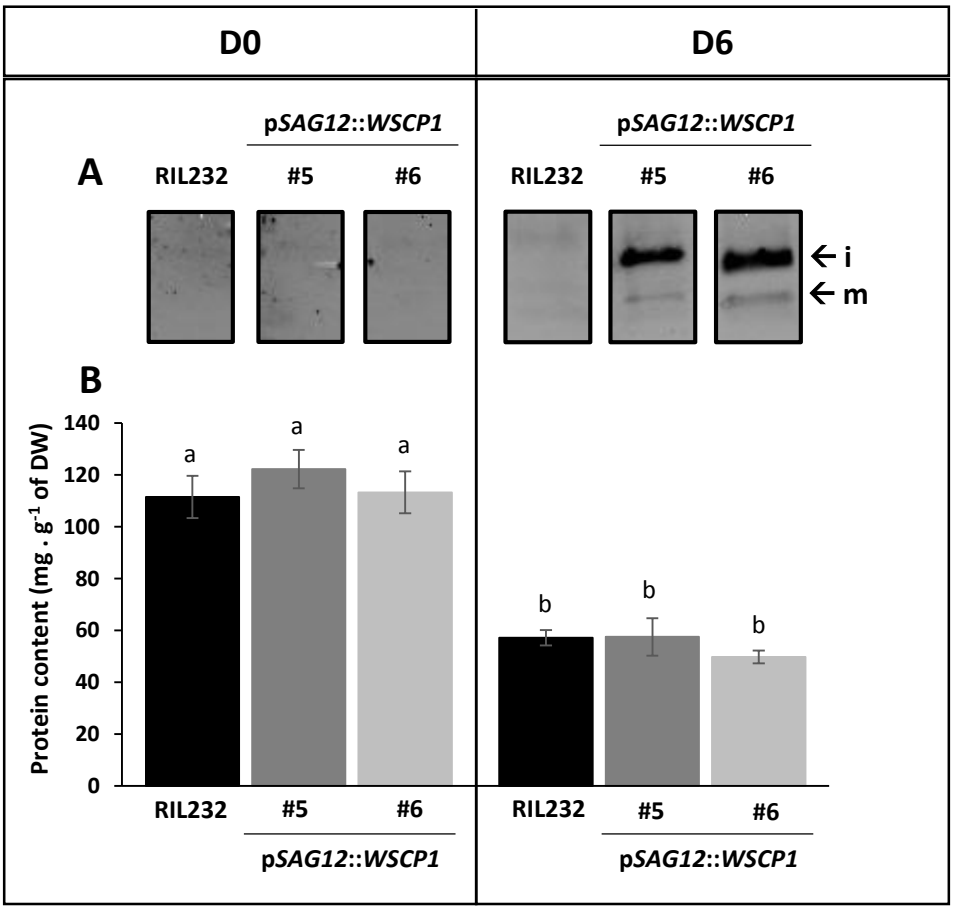


Fig. IV-D.3. Detection of WSCP1 and protein contents in leaves of RIL232 and overexpressor lines (p*SAG12*::*WSCP1* #5 and #6).

Proteins were extracted from leaves harvested at 0 (D0) and 6 days (D6) after dark-induction of senescence. **(A)** Western-blot analysis performed with anti-WSCP1 specific polyclonal antibody and a second antibody coupled with peroxidase. m: mature form and i: immature form. **(B)** Protein content values are means ± SE, n=4. Different letters indicate a statistical significant differences according to Student's t-test ($p \leq 0.01$).

D.III.2. The chlorophyll breakdown is delayed in mature leaves of pSAG12::WSCP1 lines.

During the dark induced senescence, a decrease of chlorophyll content was observed over time whatever the lines (**Fig. IV-D.2**). The SPAD value for the three lines decrease with the same trend between D0 and D4. In contrast, the mature leaf chlorophyll content at D6, is significantly higher for p*SAG12*::*WSCP1* #5 and #6 lines than for RIL232 suggesting a slower chlorophyll breakdown rate in these both lines between D4 and D6. Nevertheless, the SPAD value at D14 reach a similar level for all lines (7.61 ±1.26, 7.08 ±1.02 and 7.51 ±1.13 in SPAD value for WT, p*SAG12*::*WSCP1* #5 and 6, respectively).

D.III.3. The protein content is not difference whatever the genotype.

At D0, WSCP1 was not detected whatever the lines. In contrast, at D6, While WSCP1 protein remained not detected in Col, a strong expression was observed in both p*SAG12*::*WSCP1* lines (**Fig. IV-D.3A**). Moreover when WSCP1 is detected, two signals differing few kilo-Dalton which could correspond to the immature and the mature form of WSCP1 can be observed (**Fig. IV-D.3A**). At D0, as expected, the protein contents in mature leaves are similar whatever the lines. The same result was observed at D6 (**Fig. IV-D.3B**). However, a strong decrease in protein content could be noticed between D0 and D6, suggesting a strong proteolytic activity during this period in the senescent leaves of all lines.

D.III.4. The serine proteases are less actives in WSCP1 over-expresser.

The serine protease (SP) activities at pH 7.5 was determined by using fluorescent probes specific of this protease class (Patricelli et al., 2001 ; **Fig. IV-D.4A**). Genotypes overexpressing WSCP1 in senescent leaves (*pSAG12*::*WSCP1* n°5 and 6) have a lower overall serine protease activity than RIL232 (12.83 ± 1.07; 9.89 ± 0.89 and 9.94 ± 0.87 fluorescence intensity (UA) for RIL232, p*SAG12*::*WSCP1* #5 and #6, respectively) (**Fig. IV-D.4B**)**.** This was not due to a lower number of serine protease (same number of signal by lane) but rather to a decrease of their individual activity (all signals were attenuated) (**Fig. IV-D.4A**)**.**

D.III.5. The WSCP1 is located in the chloroplast.

WSCP1 was detected using anti-WSCP1 antibody revealed with a secondary antibody coupled to GFP shown some of the genotype, a green fluorescence detected in chloroplasts (**Fig. IV-D.5**). The detection of slight fluorescence signal in RIL232 suggest that the primary anti-body is not fully specific of WSCP1 and can detect an orthologue of WSCP1 in *Arabidopsis thaliana*. Nevertheless, the signal in RIL232

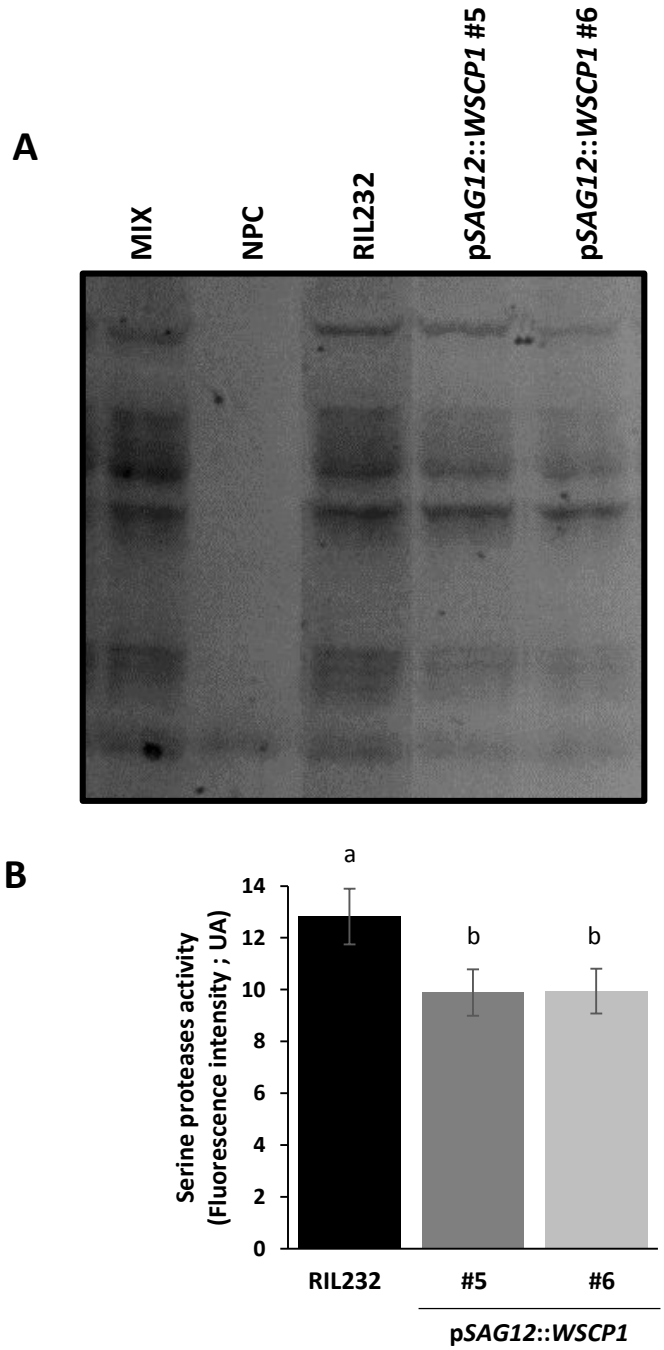


Fig. IV-D.4. Activity of serine proteases (SPs) in senescent leaves from RIL232 and overexpressor lines (p*SAG12*::*WSCP1* #5 and #6) 6 days after treatment.

(A) The soluble proteins were extracted from leaves harvested 6 days (D6) after dark-induction of senescence. SP activities profiling were achieved on protein samples of each genotypes (RIL232, p*SAG12*::*WSCP1* #5 and #6) or on a mixture of everyone (MIX) in the presence of a specific fluorescent probe of SP (FP-Rh), or in the absence of FP-Rh (no probe control: NPC) at pH 7.5 during 1 h. Samples were separated by SDS-PAGE and scanned to detect fluorescence. **(B)** Given values of fluorescence intensity are means ± SE (n=4). Different letters indicate a statistical significant differences according to Student's t-test ($p \leq 0.01$).

is far lower than the one detected in both p*SAG12*::*WSCP1* lines. In those lines, the GFP signal clearly show that WSCP1 was localized in chloroplasts (**Fig. IV-D.5**).

D.IV. Discussion

WSCPs having a putative dual function of chlorophyll protection and protease inhibition are susceptible to regulate the progression of leaf senescence. As example, BnD22, one of the only WSCPs of *Brassica napus* L. with a characterized dual function, has been clearly show to delay senescence (Etienne *et al.*, 2007; Desclos *et al.*, 2008). The same authors have also identified another WSCP in *Brassica napus* L., named WSCP1, but its role during senescence has never been demonstrated. In order to explore this putative role, an overexpression of the WSCP1 protein under the control of the SAG12 promoter (*promoterSAG12*::*WSCP1*) was developed from an *Arabidopsis thaliana* line previously described as being early senescent (RIL232; Loudet *et al.* 2002).

Interestingly, this study shown that between D0 and D6, the chlorophyll contents remain similar in mature leaf of *pSAG12*::*WSCP1* lines and RIL232. This could be explained by the absence of WSCP1 in the transgenic lines during this period as suggested by the absence of WSCP1 signal in the western blot at D0 (**Fig. IV-D.2 and Fig. IV-D.3**). Thus, even if the decline of chlorophyll since the D2 suggests that senescence is already effective in both genotypes, the WSCP1 should be not expressed in *promoterSAG12::WSCP1* during the first steps of leaf senescence. These results are in accordance with previous studies showing that the chlorophyll breakdown and the activation of *promoterSAG12* (used to control the WSCP1 overexpression) occur during early and late stages of the reorganization phase of leaf senescence, respectively (Zimmermann and Zentgraf, 2005; Desclos *et al.*, 2008). In contrast, at D6 after the dark induction of leaf senescence, the overexpression of the WSCP1 in the leaf of two *pSAG12*::*WSCP1* lines (**Fig. IV-D.3**) is concomitant with the slowdown of the chlorophyll degradation (about 20 % ; **Fig. IV-D.2**) compared to RIL232. This result is in agreement with the putative function of chlorophyll protection supported by the *in silico* analyses of the WSCP1 sequence which shows the typical motif 57-PFCPLGI-65 as well as the 4 amino acids allowing the fixation of chlorophyll (proline #51, glutamine #72 and tryptophans #106 and #170 ; (Horigome *et al.*, 2007). Moreover, this function of chlorophyll protection is also in agreement with the chloroplast localization of WSCP1, which is for the first time, clearly demonstrated in this study. (**Fig. IV-D.5**). Lastly, at D14, the chlorophyll contents are similar again in mature leaves of *pSAG12*::*WSCP1* lines and RIL232. This suggests that, at this time, WSCP1 is no longer able to protect chlorophyll in transgenic lines. This result could be explained by a WSCP1 and chlorophyll

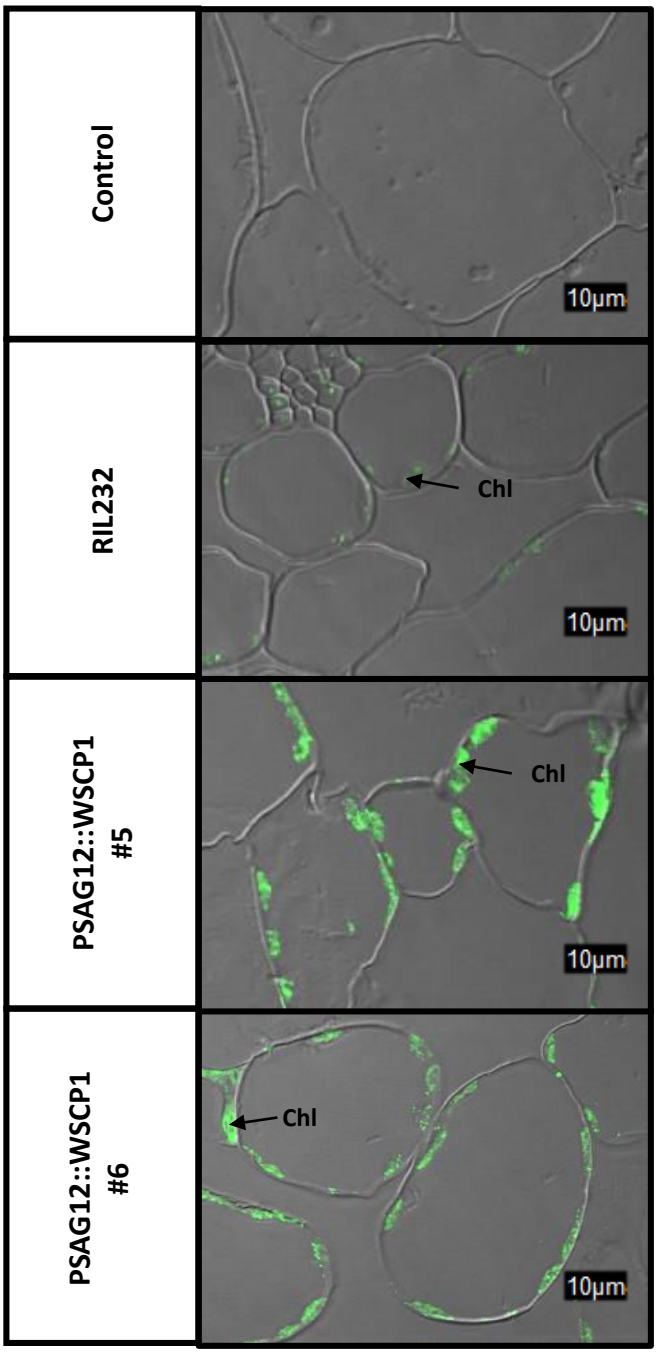


Fig. IV-D.5. Imunolocation of WSCP1 in senescent leaves from RIL232 and overexpressor lines (p*SAG12*::*WSCP1* #5 and #6). Leaves were considered as senescent when SPAD value reach 20. Immulocation of WSCP1 were performed by using an anti-WSCP1 specific polyclonal antibody and secondary antibody coupled to GFP. Control correspond to observation performed without the anti-WSCP1 antibody. Leaf cross sections were observed using a confocal microscope. Chl: Chloroplast.

breakdown by the strong catabolic activities link to the terminal and irreversible phase of leaf senescence as previously described by Zimmermann and Zentgraf, (2005).

In addition, a Künitz type motif, ([LIVM] -xDx- [EDNTY] - [DG] - [RKHDENQ] -x- [LIVM] -x (5) -Yx - [LIVM]) (Reviron *et al.*, 1992; Satoh *et al.*, 2001; Rustgi *et al.*, 2017*b*), characteristic of serine protease (SP) inhibitors is found in the WSCP1 amino acid sequence suggesting a SP inhibitor function for this protein. This assumption is supported by the significant inhibition, compared to RIL232, of the SP activity in leaves of overexpressors, observed at D6 when the WSCP1 was detected (**Fig. IV-D.4** and **Fig. IV-D.3**). surprisingly this decrease of SPs activity was not related to a higher protein content in the leaves of overexpressors compared to RIL232.

One explanation could be that leaves implemented a proteolytic system to compensate the decrease of SP activity. Indeed numerous studies shown that to cope with the suppression of proteases involved in leaf senescence, plants are able to recruit other proteases to sustain the global proteolytic activity (Pružinská *et al.*, 2017; Havé *et al.*, 2018; James *et al.*, 2018). Consequently, in our study, it cannot be excluded that other protease classes such as cysteine or aspartate proteases could compensate for the decreased activity of SPs. An alternative explanation would be that SPs, at the contrary to CPs, are not the major proteases class involve during the leaf senescence process (Guo *et al.*, 2004). Thus, considering this argue and also the partial SPs inhibition by WSCP1 in transgenic lines (about 20 % compared to RIL232), WSCP1 overexpression would have a limited effect on the global proteolytic activity in leaves and consequently a limited impact on protein content in leaves of transgenic lines compared to RIL232. Nevertheless, in despite of this minor impact on the global proteolytic activity, WSCP1 could play a major role in the protection of chloroplast integrity during leaf senescence since WSCP1 collocate with the SPs in this organelle.

D.V. Conclusion

To conclude, an isoform of WSCP have been for the first time located in chloroplasts which is in agreement with the dual function of chlorophyll protection and SPs inhibitor demonstrated for WSCP1 in this study. In *Brassica napus* L., WSCP1 could protect chlorophyll and prevent early proteolysis of chloroplastic proteins by SPs leading to a delay in leaf senescence. This assumption is especially interesting because in many crops, an inverse relationship exists between leaf senescence onset and yield, *i.e.* a late senescence lead to production gain, and *vice versa* (Jehanzeb *et al.*, 2017). In this context, WSCP1 would

be a relevant candidate to slowdown the progression of leaf senescence and thus reduce the asynchronism between the emptying period of this source organs and the period of seed filling in N.

Acknowledgments:

The authors would like to thank Dr. Nathalie Nési (UMR 1349 Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, INRA, Agrocampus Ouest, Université de Rennes) and Pr. Jean-Christophe Avice (UMR INRA–UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions N.C.S., Université de Caen Normandie) for the management of the RAPSODYN ANR program. We are most grateful to Pr Renier vand der Hoorn (The Plant Chemetics Laboratory, Department of Plant Sciences, University of Oxfordthe) for for giving us the fluorescent probes. 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.

D.VI. Analyses complémentaires

Ce chapitre intitulé « **Overexpression of a *Brassica napus* L. Water Soluble Chlorophyll binding Protein (WSCP1) to delay dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*** » correspond à un projet d'article qui nécessite des analyses complémentaires pour renforcer les données déjà présentes avant soumission :

- Tout d'abord, une étude plus approfondie des activités protéolytiques des différentes classes de protéases à l'aide de techniques d'inhibiteurs de protéases comme utilisées lors de l'article n°1 et 2 devrait être entreprise. Elle permettrait d'une part, de renforcer le résultat d'une inhibition des sérines protéases (SP) par WSCP1 lors de la sénescence et d'autre part, de vérifier si les cystéines et aspartates protéases participent à une hypothétique compensation de l'inhibition de ces SPs.

- Ensuite, une meilleure localisation cellulaire de WSCP1 à l'aide de la microscopie électronique permettrait de certifier que sa localisation est uniquement chloroplastique.

- Pour finir, une cinétique plus fine d'analyse d'expression de WSCP1 (ARNs et protéine) entre T4 et T10 permettrait d'affiner les conclusions sur le synchronisme entre la présence de WSCP1 et la protection des chlorophylles.

CHAPITRE V

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

A. Les protéases à cystéine, une classe de protéases impliquée dans la remobilisation de l'azote associée à la sénescence

Il existe plusieurs leviers d'améliorations de l'Efficience de Remobilisation de l'Azote (ERA) afin d'optimiser *in fine* l'Efficience d'Utilisation de l'Azote (EUA) du colza. **L'un de ces leviers est l'optimisation de la protéolyse lors de la sénescence des tissus sources. Cependant, cette optimisation de la protéolyse nécessite au préalable l'identification des acteurs majeurs impliqués (notamment les protéases) et une meilleure compréhension de leurs rôles dans ces processus.**

Parmi l'ensemble des protéases, les protéases à cystéine (CPs) appartiennent à la classe de protéases la plus exprimée lors de la sénescence foliaire naturelle ou induite chez le colza (Girondé *et al.*, 2016; Poret *et al.*, 2016). En outre, une étude de Girondé *et al.*, (2015*b*) montre que chez des colzas présentant des ERA contrastées, une forte ERA foliaire s'explique pour partie par une forte activité des CPs. L'ensemble de ces résultats suggère un rôle important de cette classe de protéases dans la remobilisation de l'N et donc indirectement dans l'élaboration du rendement. Ceci semble d'ailleurs largement supporté par la baisse significative du rendement (-65 %) observé chez les plantes de colza sur-exprimant une cystatine de riz (inhibiteur de la classe des cystéines protéases) par rapport au colza de type sauvage (**Fig. IV-C.1**). La classe des CPs est composée de très nombreux membres (au moins 40 membres chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*) répartis en 3 classes majeures : les PLCPs, les VPEs et les MCs. Cette grande diversité de CPs et les régulations qui sont propres à chacune nous amène à nous demander si certaines de ces protéases n'auraient pas un rôle plus important que d'autres dans l'élaboration du rendement et le remplissage en N des graines. Ainsi, parmi la multitude des CPs, la classe des PLCPs semble prédominante au vu du nombre important de ses membres induits lors de la sénescence foliaire du colza et d'Arabidopsis (Grbić, 2003; Guo *et al.*, 2004; Poret *et al.*, 2016; Pružinská *et al.*, 2017). Parmi toutes ces PLCPs induites lors de la sénescence foliaire, une a particulièrement retenu notre attention : **la protéase à cystéine SAG12**. En effet, la protéase SAG12 de par sa très forte expression dans la majorité des organes sénescents semble être un acteur majeur de la protéolyse réalisée par les CPs lors de la sénescence (Grbić, 2002, 2003; Guo *et al.*, 2004; Desclos *et al.*, 2009; Desclos-Théveniau *et al.*, 2015; Poret, 2016; Poret *et al.*, 2016; Pružinská *et al.*, 2017). Néanmoins, certaines études focalisées sur SAG12 remettent en cause l'importance de cette protéase au cours de la sénescence. En effet, (Otegui *et al.*, 2005) montrent chez des plantes *Arabidopsis thaliana* Knockout pour le gène *SAG12* (*KO-SAG12*), que la déplétion de SAG12 n'impacte ni la progression visuelle de la sénescence foliaire ni l'activité protéasique dans les « Senescent associated vacuoles » (SAVs) où SAG12 a été spécifiquement localisée (Otegui *et al.*, 2005). De plus, deux

autres études de Singh *et al.*, (2013 ; 2016) montrent que chez le riz, les deux isoformes de SAG12 (OsSAG12-1 et OsSAG12-2) seraient impliquées dans la régulation négative de la sénescence foliaire.

C'est dans ce contexte et pour tenter d'élucider le rôle de SAG12 dans les processus de remobilisation de l'azote en lien avec la sénescence qu'une première série d'études a été initiée. L'approche choisie a consisté en la suppression de la protéase **SAG12** et en l'analyse des éventuelles conséquences sur les paramètres de remobilisation de l'N, le remplissage des grains et l'élaboration du rendement.

A.I. La protéase SAG12 joue un rôle important durant la sénescence en condition de forte disponibilité en N (HN)

Dans la mesure où le colza est une plante difficile à transformer (génome tétraploïde), nous avons choisi de réaliser l'étude fonctionnelle de la protéase SAG12 chez un mutant KO-SAG12 (*sag12*; SALK_124030), disponible chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. L'analyse comparative des phénotypes des plantes *sag12* et du sauvage (Col) cultivées en condition fort N (HN) est en accord avec les résultats précédemment obtenus par Otegui *et al.*, (2005). En effet, aucune différence en terme de biomasse et de progression visuelle de la sénescence n'est observée entre les génotypes et ce, quel que soit le stade de développement (**Figs. IV-A.1, IV-A.2 et IV-A.3**). Grâce à un marquage au ^{15}N, nous avons également montré que la répartition de l'N entre les organes était similaire entre les deux génotypes suggérant que, dans ces conditions de culture non limitantes en N, le rôle de SAG12 dans les processus d'allocation de l'N vers les différents organes semble mineur (**Fig. IV-B.3**). Par ailleurs, au vue des rendements et des teneurs en azote des graines similaires chez les plantes *sag12* et Col, l'hypothèse d'un rôle crucial de SAG12 dans le remplissage en azote des graines et l'élaboration du rendement semblait peu probable.

Ces premiers résultats suggèrent que l'activité protéolytique globale au sein des différents organes en sénescence est aussi efficace chez les génotypes Col et *sag12.* Cette hypothèse, bien qu'assez surprenante puisque SAG12 est l'une des protéases les plus induites lors de la sénescence foliaire chez *Arabidopsis thaliana* (Guo *et al.*, 2004; Pružinská *et al.*, 2017), expliquerait l'absence de défaut de remobilisation de l'N chez *sag12* cultivés en condition HN. Afin de tester cette hypothèse, nous nous sommes intéressés à l'activité protéolytique globale dans les feuilles, organe source majeur pour le remplissage en N des graines (Rossato *et al.*, 2001; Girondé *et al.*, 2015*a*). Cette activité protéasique globale ne révélant effectivement aucune différence entre les feuilles sénescentes de Col et *sag12 (***Fig.**

IV-A.4*)*, nous avons entrepris d'étudier plus finement l'activité des classes de protéases intervenant majoritairement lors de la sénescence (*i.e.* les protéases à cystéine, à sérines et à aspartates). Dans les feuilles de Col et *sag12,* nous avons observé des différences majeures d'activités pour certaines classes de protéases alors que pour d'autres classes, les activités restaient similaires (**Fig. IV-A.5**). Ainsi, l'absence de différence d'activité sérine protéases (SPs) observée entre les deux génotypes suggère que les SPs ne sont pas (ou peu) réquisitionnées pour suppléer le déficit en SAG12. De manière surprenante, l'activité des protéases à cystéine est également maintenue chez *sag12* et ce, en dépit de la déplétion de SAG12. Ce dernier résultat suggère que **d'autres CPs seraient induites pour palier la baisse d'activité des protéases à cystéine engendrée par l'absence de SAG12** et met en lumière le rôle majeur de cette protéase lors de la protéolyse associée à la sénescence. Cette observation est en accord avec des résultats précédemment obtenus par Pružinská *et al.*, (2017) qui, à l'aide de techniques basées sur des sondes spécifiques des CPs (DCG-04, sonde biotinylée et MV151, sonde fluorescente), ont montré que chez le même mutant *sag12* que celui que nous avons utilisé (SALK_124030), le profil d'activité des CPs est indiscernable de celui de Col. Ce résultat peut s'expliquer par la redondance fonctionnelle des CPs qui leur permettrait de se substituer les unes aux autres dans les feuilles sénescentes. En effet, des CPs, et plus particulièrement les PLCPs potentiellement responsables de ce maintien d'activité, ont été récemment identifiées chez *Arabidopsis thaliana* par Pružinská *et al.*, (2017). Parmi ces PLCPS, RD21A, RDL2, RD19, AALP et ALP2 sont des protéases connues pour intervenir dans la protéolyse foliaire associée à la sénescence du colza (Poret *et al.*, 2016). Ces protéases, permettant en partie d'expliquer la compensation de l'absence de SAG12, pourraient constituer des cibles pertinentes pour la sélection de variétés (notamment de colza) présentant une meilleure efficience de remobilisation de l'N (ERA). En outre, l'analyse différentielle des activités des différentes classes de protéases entre *sag12* et Col a permis de révéler une forte augmentation (de 91 % ± 3.44 %) de l'activité des aspartates protéases (APs) chez *sag12* (**Fig. IV-A.5**). Ce résultat inattendu montrant que **l'absence de la protéase à cystéine SAG12 est partiellement compensée par l'induction de protéases appartenant à une classe différente, à savoir des APs**, suggère une nouvelle fois que la protéase SAG12 jouerait un rôle majeur dans les processus de remobilisation de l'N durant la sénescence. Il n'existe à ce jour pas de sonde suffisamment spécifique pour révéler les APs actives (Hoorn et Kaiser, 2012), nous avons donc dû utiliser la technique du zymogramme couplée à un séquençage protéique (Q-TOF LC/MS) pour tenter d'identifier les APs impliquées dans ce processus. Cette technique plus généraliste a, par le passé, déjà permis d'identifier des APs actives provenant d'un extrait protéique de feuilles sénescentes de colza (Girondé *et al.*, 2016). Cette approche nous a permis de détecter une AP spécifiquement active chez le mutant *sag12* et absente chez Col. Elle correspond à une CND41-like (AED1 ; At5g10760) dont

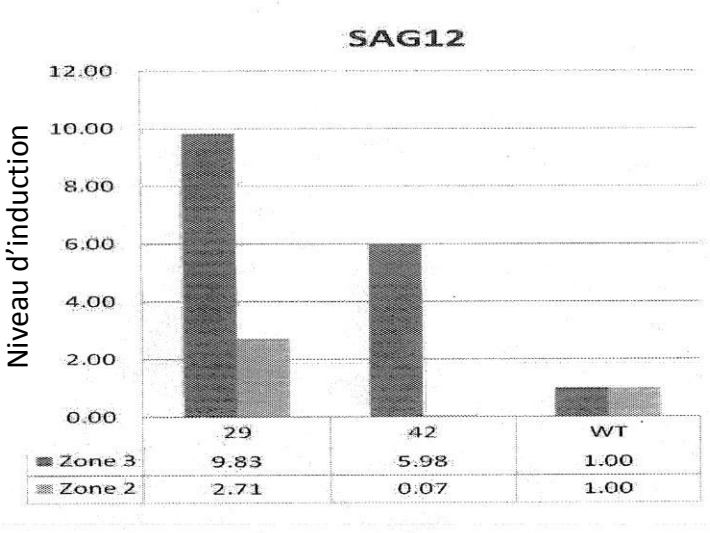


Fig. V.1. Expression relative (par rapport au Col) du gène *SAG12* dans des feuilles peu sénescentes (zone 2) et très sénescentes (zone 3) de deux lignées mutantes *AED1 (lignée 29 et 42)* en comparaison au WT (adapté de Tai, 2011).

l'expression relative du gène est 3 fois plus forte chez les plantes mutantes (**Fig. IV-A.6**). **Ces résultats suggèrent que la protéase à aspartate CND41-like fait partie des protéases sollicitées pour suppléer l'absence de SAG12**. Ces travaux sont en accord avec une étude récente réalisée chez un mutant d'autophagie d'*Arabidopsis* (*atg5*) montrant une induction conjointe de l'expression de *SAG12* et *AED1* (3.33 fois) dans des feuilles dont la sénescence est induite par une faible disponibilité en N (Havé *et al.*, 2018). D'autres travaux réalisés par (Tai, 2011) renforcent encore l'hypothèse d'une coopération entre SAG12 et AED1 puisqu'ils montrent que des plantes d'*Arabidopsis thaliana* KO pour le gène *AED1* présentent une induction de l'expression du gène *SAG12* d'environ 10 fois dans les feuilles sénescentes par rapport au sauvage (**Fig. V.1**). Il est intéressant de noter que, comme SAG12, AED1 (CND41-like) est une protéase spécifique de la sénescence comme l'ont montrées plusieurs études réalisées chez *Nicotiana tabacum* et *Arabidopsis thaliana* (Kato *et al.*, 2004; Winter *et al.*, 2007; Diaz *et al.*, 2008). Chez *Nicotiana tabacum,* des études montrent que CND41 est localisée dans les chloroplastes et qu'elle est capable, *in vitro*, de dégrader la RuBisCO (Murakami *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 2004, 2005). En s'appuyant simplement sur ce résultat, il est d'autant plus surprenant qu'une protéase localisée dans un autre compartiment que SAG12 (qui elle est localisée dans les SAVs) puisse participer à la compensation de son activité. Néanmoins, il est important de préciser que dans les chloroplastes, seule la forme sous la forme proenzyme de CND41 a été identifiée (Kato *et al.*, 2005). L'activité protéolytique de CND41 étant maximale à pH acide (Murakami *et al.*, 2000), la dégradation de la RuBisCO par la protéase CND41 n'est pas optimale à l'intérieur des chloroplastes et nécessiterait que les deux protéines (RuBisCO et CND41) soient transférées dans des compartiments à pH acides tels que les SAVs ou la vacuole centrale (pH 5,5). Cette hypothèse de migration des protéines plastidiales vers des vacuoles lytiques est en accord avec des études montrant que la RuBisCO et d'autres protéines du stroma sont présentes dans des SAVs (Otegui *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2008; Carrión *et al.*, 2013). Ainsi, il n'est pas exclu que la protéase CND41-like (AED1) puisse également se retrouver dans des vacuoles en empruntant, par exemple, un trafic vésiculaire assuré par des « RuBisCO-containing bodies » (RCBs) ou d'autres voies autophagiques (Ishida *et al.*, 2008; Otegui, 2018). En partant du postulat qu'un processus post-traductionnel est impliqué dans l'activation de CND41 (Kato *et al.*, 2005), on peut suggérer que des protéases participent à l'activation de AED1 dans les SAVs et/ou d'autres vacuoles lytiques.

Pour conclure sur ces phénomènes de compensations au niveau foliaire en condition HN, ces résultats suggèrent que **les APs et particulièrement la protéase à aspartate CND41-like (AED1) conjointement aux CPs participeraient à la compensation de la protéase SAG12 afin de maintenir une protéolyse efficace.** La mise en place de systèmes protéolytiques compensatoires par les plantes *sag12,*

afin de maintenir la teneur en azote des graines mais également le rendement, démontre à quel point **la protéase SAG12 est majeure dans les processus de remobilisation d'N associés à la sénescence foliaire.**

Néanmoins, bien que la remobilisation de l'N soit considérée comme la principale source d'N pour le remplissage des graines (Tegeder et Masclaux-Daubresse, 2017), il n'est pas exclu qu'en condition de forte disponibilité en N (HN), une meilleure absorption racinaire d'N par les plantes *sag12* puisse également compenser un possible défaut d'allocation d'N endogène vers les graines. En effet, des travaux montrent que le statut azoté interne régule positivement l'architecture racinaire et l'absorption de l'N (Nacry *et al.*, 2013; Bellegarde *et al.*, 2017; Gent et Forde, 2017). Ainsi, dans notre étude, il peut être suggéré que chez *sag12,* le possible défaut de remobilisation de l'N endogène combiné à la force puit générée par la formation des graines, puisse stimuler l'absorption racinaire d'N afin d'allouer l'N absorbé aux graines et ainsi permettre un remplissage identique à celui observé chez Col. Cependant, cette hypothèse est infirmée par nos travaux qui montrent que l'architecture racinaire et les capacités d'absorption de l'N sont similaires chez les deux génotypes (**Figs. IV-B.1 et IV-B.2**). Ces résultats combinés aux précédents montrent donc que chez les *sag12* cultivés en condition HN, les systèmes protéolytiques mis en place au niveau foliaire pour pallier l'absence de SAG12 sont suffisamment efficaces pour assurer le remplissage en N des graines.

Perspectives :

L'analyse des activités des différentes classes de protéases associée au zymogramme nous a permis de faire ressortir certains acteurs de la protéolyse telle que la protéase AED1 qui serait étroitement liée à SAG12. Il serait donc intéressant d'approfondir le lien entre ces deux protéases qui semblent jouer un rôle majeur lors de la sénescence. **Une des premières stratégies consisterait à s'appuyer sur l'étude de Tai, (2011) en axant l'étude des KO-*AED1* sur des analyses protéomiques, en suivant le profil d'expression de SAG12 et en analysant finement les activités des différentes classes de protéases**. **Une seconde stratégie envisageable serait de réaliser un double mutant KO pour les gènes *AED1* et *SAG12* afin de vérifier si chez ces plantes, un phénotype visuel de la sénescence peut être observé et si le rendement ainsi que la remobilisation de l'N sont impactés.** Finalement, une approche par immunolocalisation subcellulaire de SAG12 et AED1 pourrait également nous permettre de renforcer l'hypothèse d'une possible co-localisation de ces deux protéases dans des vacuoles lytiques telles que les SAVs.

De plus, lors de l'introduction bibliographique, nous avons montré que les différentes voies vésiculaires, autophagiques ou non, étaient impliquées dans la protéolyse des protéines foliaires telles que

la RuBisCO. Le lien avec l'autophagie semble fort puisque, récemment, Havé *et al.*, (2018) ont montré que des plantes mutantes KO pour le gène *atg5* (mutant d'autophagie) présentent une forte induction de nombreuses protéases telles que SAG12 et AED1**. Ainsi, l'étude des processus autophagiques chez les simples mutants KO-*SAG12* et KO-*AED1* mais également chez les doubles mutants KO-*SAG12-AED1* pourrait permettre de valider le rôle de ces deux protéases dans ces processus.**

Une autre perspective serait d'approfondir l'étude préliminaire réalisée lors de ce travail de thèse sur les colzas sur-expresseurs de cystatine (OCI), un inhibiteur naturel des cystéines protéases. En effet, cette étude préliminaire montre qu'en dépit d'une inhibition de toutes les cystéines protéases conduisant à une baisse du rendement de plus de 60 % chez les plantes OCI par rapport au sauvage, la teneur en N des graines du sur-expresseur est supérieure au sauvage dans les produits récoltés (**Figs. IV-C.1 et IV-C.2**). Ainsi, même si la production de graines est moins importante, la plante semble s'adapter afin de produire des graines dont les réserves azotées ne semblent pas affectées. Un tel maintien des teneurs en N suggère la mise en place de systèmes protéolytiques qui viennent compenser l'inhibition de l'ensemble des protéases à cystéine. **Il serait donc intéressant d'analyser l'activité des différentes classes de protéases chez ces plantes afin d'identifier les classes et plus précisément, les protéases potentiellement impliquées dans ces processus compensatoires chez le colza.** Cela permettra de vérifier si les observations réalisées sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (induction d'aspartates protéases et notamment d'AED1) sont retrouvées chez le colza, et de proposer éventuellement de nouveaux candidats pour la sélection variétale de colza présentant une ERA optimisée.

A.II. La protéase SAG12 joue un rôle crucial durant la sénescence en condition de faible disponibilité en N (LN)

Dans le cadre de nos travaux, une limitation en azote (LN) a été utilisée pour induire la sénescence et ainsi contraindre les plantes (*sag12* et Col) à induire leurs systèmes protéolytiques, notamment la protéase SAG12, (Gombert *et al.*, 2006; Desclos *et al.*, 2008; Poret, 2016) afin d'optimiser les processus de remobilisation d'N endogène. Ce traitement appliqué aux plantes *sag12* et Col a permis **pour la première fois d'observer un phénotype pour le mutant *sag12*** qui, dans ces conditions d'alimentation azotée, **présente une diminution du rendement et de la teneur en N des graines par rapport au sauvage** (**Fig. IV-A.2**). Ces résultats montrent clairement que la protéase SAG12 joue un rôle crucial dans la remobilisation d'N associée au remplissage des graines mais également dans l'élaboration du rendement. L'analyse de la répartition du ^{15}N dans les différents organes en fin de cycle révèle que le défaut d'allocation d'N aux

graines n'est pas dû à une séquestration de l'N dans les feuilles (**Fig. IV-B.3**). En effet, dans ces organes, il semble que l'augmentation des activités protéolytiques globales chez *sag12* permette d'obtenir une remobilisation aussi efficace que chez les Col. Cela suggère que même en LN, la plante est toujours capable de compenser l'absence de SAG12 au niveau foliaire, notamment en maintenant, comme en situation HN, une activité des protéases à cystéine identique à celle observée dans les feuilles de Col (**Fig. IV-A.5**). Comme en condition HN, les SPs présentent également une activité similaire entre les 2 génotypes et ne semblent donc pas participer à la compensation de SAG12. De manière plus surprenante par rapport aux résultats obtenus en HN, nous n'observons plus d'induction en LN de l'activité des protéases à aspartate chez *sag12* par rapport à Col. En fait, il y a fort à penser que, comme observé pour l'activité protéolytique globale, chez Col et *sag12*, l'activité des protéases à aspartates est certainement maximale en réponse à la contrainte azotée et empêche tout phénomène de compensation de SAG12 par ces APs dans ces conditions.

L'ensemble de ces résultats montre que la plante tente de compenser la déplétion de SAG12 dans les feuilles lorsqu'elle est sous contrainte azotée. Cette compensation, même si elle pouvait n'impliquer que les CPs, reste néanmoins suffisante dans les feuilles pour maintenir une remobilisation d'N efficace. Compte-tenu de cette compensation foliaire suffisante et du phénotype observé chez les *sag12* cultivés en condition LN (*i.e.* baisse de la production et de la teneur en N des graines), l'implication de SAG12 dans la remobilisation d'N depuis des organes sources autres que les feuilles est fortement suspectée. La comparaison de la répartition du ^{15}N dans les différents organes entre les deux génotypes cultivés en LN a permis de valider cette hypothèse puisqu'en effet, il a été observé une accumulation de ^{15}N au niveau racinaire et une diminution de ^{15}N dans les graines des plantes *sag12*. Par ailleurs, nous avons montré que cette séquestration racinaire d'N semble principalement associée à une mauvaise dégradation des protéines et non pas à un défaut d'exportation des acides aminées issus de la protéolyse (**Figs. IV-B.3 et IV-B.4**). Ainsi, de manière surprenante, ces résultats suggèrent que l'absence de la protéase SAG12 conduit à un défaut de remobilisation de l'N racinaire au détriment du remplissage en N des graines. Bien que très peu d'études portent sur la remobilisation de l'N racinaire en faveur des graines et des mécanismes qui y sont associés, une étude chez le colza de Rossato *et al.,* (2001) a montré que plus de 11% de l'N des graines provenaient de la remobilisation de l'N racinaire. En outre, Girondé *et al.*, (2015*a*) ont montré que chez des génotypes de *Brassica napus* L. présentant une forte efficience de remobilisation de l'N (ERA) en condition limitante en N, la part d'N des graines provenant des racines était loin d'être négligeable. Ainsi, nos résultats sont en accord avec ces travaux et **démontrent l'importance de la protéolyse racinaire lorsque les plantes sont soumises à un stress azoté** et que l'N endogène devient la source majoritaire lors

du remplissage des graines. Par ailleurs, notre étude suggère pour la première fois une implication de la protéase SAG12 dans la dégradation de protéines de racines, compartiment dans lequel cette protéase n'a jamais été localisée. Une détection de la protéine (western-blot) et des transcrits (PCR) de SAG12 appuyée par l'utilisation de plantes transgéniques p*SAG12*::*UIDA* (coloration GUS) montrent effectivement, **pour la première fois, la présence de la protéase SAG12 au sein de la stèle racinaire** (**Figs. IV-B.5 et IV-B.6**). Cette expression n'est détectable que lorsque les plantes sont au stade reproducteur et est d'autant plus forte que les plantes sont soumise à un stress azoté.

La détection de la protéase SAG12 au niveau racinaire associée à un défaut de la protéolyse et de la remobilisation en N dans les racines des plantes *sag12* sont des résultats nouveaux suggérant que cette protéase serait largement active dans cet organe. Cette hypothèse a été vérifiée en suivant d'une part, l'activité protéasique des CPs et d'autre part, l'activité protéasique globale au niveau racinaire chez les deux génotypes cultivés en LN (**Fig. IV-B.7**). Ainsi, il a été montré que chez les *sag12* cultivés en LN, l'activité protéasique des CPs est significativement plus faible que chez les Col. Ces résultats confirment que dans ces conditions où la remobilisation de l'azote est primordiale pour le remplissage des graines, **la protéase SAG12 est essentielle pour assurer une activité maximale des protéases à cystéine dans les racines**. Toutefois, il a également été montré qu'en dépit de cette plus faible activité des protéases à cystéine, l'activité protéasique globale dans les racines de *sag12* est similaire à celle observée chez Col, suggérant une nouvelle fois une compensation par d'autres systèmes protéolytiques que les cystéines protéases pour palier à l'absence de SAG12. Néanmoins, notre étude montre clairement que ce maintien de l'activité protéolytique globale dans les racines de *sag12* n'est pas suffisant pour assurer une dégradation optimale des protéines racinaires puisque leur teneur est significativement supérieure à celle observée chez Col (**Fig. IV-B.4**). Ce résultat est particulièrement intéressant puisqu'il suggère, au niveau racinaire, l'existence de cibles protéiques spécifiques de SAG12 que les systèmes protéolytiques compensatoires ne seraient pas capables de dégrader. Compte-tenu de l'impact de la déplétion de SAG12 sur les teneurs en N des graines des plantes cultivées en LN, la dégradation de ces cibles protéiques spécifiques semble constituer une source d'N essentielle au remplissage des graines.

L'ensemble de ces résultats montrent **l'importance de la protéase SAG12 dans la protéolyse et la remobilisation de l'N racinaire lorsque les plantes sont confrontées à une faible disponibilité en N**. Ainsi, dans ces conditions, la plante afin de répondre à la demande en N des graines en formation remobilise l'N de l'ensemble de ses organes et notamment des racines. Nos travaux montrent pour **la première fois, la présence de la protéase SAG12 au sein de la stèle racinaire** ainsi que **son rôle crucial lors d'une contrainte en N**. En effet, la plante va induire des acteurs de la protéolyse tels que SAG12 dans les racines pour

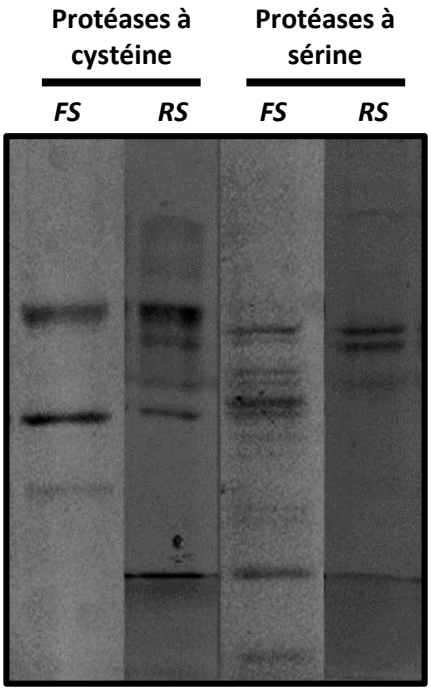


Fig. V.2. Profil des protéases à cystéine et à sérine dans les feuilles et les racines sénescentes d'*Arabidopsis thaliana*. Les profils protéasiques ont été obtenus en utilisant la sonde MV201 spécifique des PLCPs et la sonde FP-Rh spécifique des SPs à pH 5,5. Les protéines ont été extraites de feuilles et de racines sénescentes récoltée à 85 DAS (remplissage des graines). FS : Feuilles sénescentes ; RS : Racines sénescentes.

répondre à la carence en N. L'impact de l'absence de SAG12 sur rendement et la teneur en N des graines lors d'une limitation en N démontre l'importance du rôle de cette protéase au niveau racinaire lorsque la plante doit répondre à une contrainte nutritionnelle azotée.

Perspectives :

La présence au niveau racinaire d'une protéase connue pour sa localisation et son rôle majeur dans les feuilles sénescentes ouvre de nouvelles perspectives de recherches. En effet, notre étude a permis de mettre en lumière une implication de cette protéase dans la dégradation de protéines racinaires essentielle pour assurer le remplissage des graines lorsque les plantes doivent faire face à une carence en N. Il serait donc intéressant **d'approfondir le rôle de la protéase SAG12 au cours de la remobilisation de l'N racinaire lorsque les plantes sont contraintes par des conditions limitantes en N**. Dans un premier temps, l'hypothèse suggérée par nos travaux de l'existence au niveau racinaire de cibles protéiques spécifiques de SAG12 est particulièrement intéressante. Ainsi, l'identification de ces protéines *via* des approches différentielles par électrophorèses bidimensionnelles (comparaison des protéomes racinaires de *sag12* et col en fin de culture) permettrait de mieux appréhender l'origine de cette spécificité (séquence et/ou compartimentation particulières de ces protéines).

Par ailleurs, dans notre étude, l'existence d'un lien fort entre les protéases SAG12 et AED1 est largement suspecté dans les feuilles sénescentes. Chez *Arabidopsis thaliana* il existe deux isoformes de AED1. L'une serait spécifique des racines (At5g10770) et l'autre des feuilles (At5g10760) (Céline Masclaux-Daubresse, communication personnelle). Afin de compléter l'étude de SAG12 au niveau racinaire, **il serait intéressant d'étudier les profils d'expression de ces isoformes d'AED1, notamment dans les racines afin de vérifier si dans cet organe, ces protéases à aspartate sont également capables de compenser l'absence de SAG12 et ainsi renforcer l'hypothèse d'un couple protéolytique SAG12-AED1 au niveau racinaire.**

Ce travail soulève également des interrogations quant aux systèmes protéolytiques impliqués dans la sénescence racinaire, un processus qui reste à ce jour très peu étudié chez les végétaux (Wojciechowska *et al.*, 2017). Des études préliminaires réalisées dans le cadre de ce travail doctoral, suggèrent que certaines protéases induites lors de la sénescence racinaire seraient différentes de celles impliquées au cours de la sénescence foliaire. En effet, l'utilisation de sondes fluorescentes spécifiques des PLCPs (MV201) et des SPs (FP-Rh) montrent des profils de protéases assez différents entre ces deux organes (**Fig. V.2**). **Ainsi, une identification et une caractérisation des protéases actives dans les racines durant la sénescence** pourraient permettre de mieux comprendre l'implication de protéases spécifiques

dans la remobilisation de l'N depuis ces organes, protéases qui semblent être déterminantes lors du remplissage des graines de plantes soumises à une privation en N.

Par ailleurs, la présence avérée de la protéase SAG12 dans les racines ouvre de nouvelles perspectives d'améliorations variétales, notamment chez le colza dont le pivot est riche en protéines et notamment, en protéines de réserve, dont certaines sont dégradées durant le remplissage des graines (Rossato *et al.*, 2001, 2002). Il serait ainsi particulièrement intéressant d'étudier l'expression des deux orthologues de la protéase SAG12 d'*Arabidopsis thaliana* présents chez *Brassica napus* L. (BnaSAG12-1 et BnaSAG12-2) dans les racines de génotypes présentant des EUA (et plus particulièrement des ERA) contrastées en réponse à de faible niveau d'intrants (Girondé *et al.*, 2015*a*). **Une telle étude permettrait de vérifier si la variabilité de l'EUA de ces génotypes peut ou non s'expliquer par une variabilité génotypique de l'ERA racinaire dont l'efficacité pourrait dépendre de l'expression plus ou moins importante des deux isoformes de la protéase SAG12.** Ces études permettraient également de vérifier si la protéase SAG12 est spécifiquement impliquée ou non dans la protéolyse des protéines de réserve racinaire du colza.

L'ensemble de ces perspectives pourrait permettre de mieux appréhender le rôle de SAG12 dans la remobilisation de l'N racinaire mais également, d'identifier de nouveaux candidats (protéines cibles de SAG12, isoforme racinaire de AED1, identification de protéases spécifiques aux racines) **potentiellement intéressants pour la sélection de nouvelles de variétés de colza présentant une EUA optimisée en conditions de faibles apports d'intrants azotés.**

B. Les WSCPs, des inhibiteurs capables d'impacter la sénescence.

Un autre levier d'optimisation de l'EUA du colza consiste à prolonger la durée de vie des feuilles en retardant la sénescence foliaire afin notamment de réduire l'asynchronisme existant entre la période de vidage de ces organes sources et la période de remplissage des graines (Kusaba *et al.*, 2013). En effet, Jehanzeb *et al.*, (2017) évoquent l'existence d'une relation inverse entre la sénescence des feuilles et le rendement, c'est-à-dire que la sénescence précoce entraîne une perte de rendement, et inversement. Dans cette optique, les « **Water Soluble Chlorophyll binding Proteins** » (WSCPs), des protéines connues pour pouvoir porter une double fonction de protection des chlorophylles et d'inhibition de protéases, présentent un réel intérêt. En effet, des études conduites chez le colza montrent que certaines de ces protéines telles que BnD22 sont capables de moduler la progression de la sénescence (Reviron *et al.*, 1992; Etienne *et al.*, 2007). Plusieurs isoformes de WSCPs, présentant potentiellement une double fonction, ont

d'ores et déjà été identifiées chez le colza. L'une d'entre elles, WSCP1, identifiée dans de jeunes feuilles de colza dont la sénescence a été induite par une pulvérisation au méthyl jasmonate (Desclos *et al.,* 2008), n'avait jusqu'à présent jamais fait l'objet d'analyse fonctionnelle. L'alignement de la séquence protéique de WSCP1 avec celle de BnD22, connue pour présenter une double fonction, met en évidence de fortes homologies de séquences (**Fig. IV-D.1**). La présence dans les séquences des deux WSCPs de motifs caractéristiques des fonctions précédemment évoquées suggère que WSCP1 pourrait avoir des caractéristiques fonctionnelles semblables à BnD22. Ainsi, l'analyse bio-informatique met en lumière, dans la séquence de WSCP1, la présence d'un motif Künitz spécifique des inhibiteurs de protéases à sérine ([LIVM] -xDx- [EDNTY] - [DG] - [RKHDENQ] -x- [LIVM] -x (5) -Yx- [LIVM]) (Satoh *et al.*, 2001; Rustgi *et al.*, 2017*b*). De la même manière, des sites de fixation à la chlorophylles peuvent être observés : le motif (57-PFCPLGI-65) et les 4 acides aminés permettant la fixation aux chlorophylles (proline, glutamine et deux aspartates respectivement en position 51, 72, 106 et 170) (Satoh *et al.*, 2001; Horigome *et al.*, 2007). La double fonction hypothétique de WSCP1 en fait donc un candidat intéressant pour retarder la progression de la sénescence foliaire et ainsi allonger la durée de vie des feuilles. Aussi, dans le cadre de cette thèse, des travaux ont été initiés afin de vérifier si WSCP1 est en mesure de retarder la sénescence foliaire. Pour cela, nous avons choisi de sur-exprimer cette protéine de colza spécifiquement durant la sénescence (construction *promoteurSAG12 ::WSCP1*) chez une lignée recombinante fixée d'*Arabidopsi*s (RIL232 ; Loudet *et al.*, (2002)) dont le phénotype hyper sénescent a précédemment été caractérisé par Diaz *et al.*, (2005). Outre la facilité de transformation, *Arabidospis thaliana* présente également l'avantage de ne posséder au sein de son génome aucune WSCP présentant des homologies de séquences avec WSCP1. L'exposition des feuilles matures à l'obscurité, utilisé, à l'instar des travaux de Pružinská *et al.*, (2017), pour induire la sénescence, a permis de montrer que par rapport à ce qui est observé dans la RIL232, la surexpression de WSCP1 lors de la sénescence chez les lignées transformées, entraine un retard de la chute des teneurs en chlorophylles (**Fig. IV-D.2**). Ce résultat permet d'une part, de conforter *in vivo* l'hypothèse émise à partir de l'analyse *in silico*, du **rôle de WSCP1 dans la protection des chlorophylles** et d'autre part, de suggérer que son expression **permettrait de retarder la progression de la sénescence**. En outre, *via* des études d'immunolocalisation, nous avons montré pour la première fois une **localisation chloroplastique de WSCP1**, ce qui est totalement en accord avec sa fonction présumée de protection des chlorophylles. Par ailleurs, comparativement au RIL232, nous avons montré une diminution significative de l'activité foliaire des sérines protéases (SPs) chez les surexpresseurs, concomitante avec la forte accumulation de WSCP1 (**Fig. IV-D.3**). Ce résultat suggère très fortement que WSCP1 aurait également une fonction inhibitrice de protéases à serine, confirmant une nouvelle fois l'analyse *in silico*. Toutefois, au

cours de cette étude, il a été montré que les teneurs foliaires en protéines étaient similaires entre les génotypes (**Fig. IV-D.3**), ce qui laisse supposer que la surexpression de WSCP1 n'aurait aucun effet sur la protéolyse foliaire. Ce résultat pourrait s'expliquer par une induction de systèmes protéolytiques, de la même classe ou non, capables de compenser l'inhibition des protéases à sérine par WSCP1, de façon similaire à ce que nous avons mis en évidence lors de nos travaux sur SAG12. Une autre explication serait que les SPs, contrairement aux CPs, ne sont pas la principale classe de protéases impliqué dans le processus de sénescence foliaire (Guo *et al.*, 2004). Ainsi, l'inhibition, qui plus est partielle, des SPs par WSCP1 dans les lignées transgéniques n'aurait qu'un effet limité sur l'activité protéolytique globale des feuilles et donc un impact limité sur leur teneur en protéines. Néanmoins, malgré cet impact mineur sur l'activité protéolytique globale, WSCP1 pourrait jouer un rôle majeur dans la protection de l'intégrité des chloroplastes pendant la sénescence foliaire puisque WSCP1 colocalise avec les SPs dans cet organite.

Perspectives :

Outre les expériences en cours, évoquées à la fin du chapitre IV-D, des perspectives à plus long terme qui émergent de ce travail.

Par exemple, malgré l'absence d'effet sur les teneurs en protéines foliaires, il n'est pas impossible que la remobilisation soit tout de même impactée par la sur-expression de WSCP1, surtout en situation de carence en N, qui aura pour effet, de permettre une expression encore plus forte de WSCP1, *via* promoteur *SAG12*. **Il serait donc intéressant d'étudier chez les plantes p*SAG12*::*WSCP1,* le rendement et la teneur en N des graines en condition limitante en N.** Cette étude permettra de confirmer si l'expression d'une WSCP lors de la sénescence et donc un retard de la sénescence impacte effectivement l'ERA et améliore l'EUA.

Par ailleurs, a l'instar des surexpresseurs de cystatine (OCI) qui sont un outil de choix pour étudier l'implication des protéases à cystéine, **la surexpression de WSCP1 lors de la sénescence est aussi un moyen d'étudier plus largement le rôle des SPs lors de ce processus et leur(s) rôle(s) dans la remobilisation de l'N**. En effet, il est également intéressant d'étudier les SPs puisque ces protéases constituent, en nombre de membres, la plus grande classe de protéases chez les plantes (van der Hoorn, 2008) et semblent jouer un rôle important dans la remobilisation de l'N chez le colza (Girondé *et al.*, 2016; Poret *et al.*, 2016). Nos résultats ne montrant aucun effet en termes de teneur en protéines, alors qu'une partie des sérines protéases est inhibée, nous supposons la mise en place de systèmes de compensation qu'il serait intéressant d'identifier. Une analyse des activités protéasiques couplée à une approche

protéomique pourrait être entreprise pour confirmer cette hypothèse. Ainsi, l'utilisation de sondes spécifiques des classes de protéases couplée à des zymogrammes pourraient permettre de déceler des protéases capables de compenser l'inhibition des SPs, et qui seraient étroitement liées aux SPs comme ceci a pu être fortement suggéré pour le couple de protéases AED1/SAG12. Cela mettrait en avant le rôle des SPs lors de la sénescence et permettrait de fournir de potentielles nouvelles cibles afin d'alimenter en candidats la sélection variétale visant à améliorer l'ERA .

Enfin, bien que leur fonction de protection des chlorophylles ainsi que la localisation de WSCP1 dans les chloroplastes ne plaident pas en faveur d'un rôle de ces protéines dans les racines, leur fonction d'inhibiteur de protéases n'exclut pas totalement leur présence dans cet organe. En effet, il peut être suggéré que, dans les racines et notamment le pivot de colza riche en protéines de réserves, la fonction d'inhibition de protéase des WSCPs pourraient permettre de contrôler l'action des protéases racinaires impliquées dans la remobilisation de l'N dans cet organe. Afin de tester cette hypothèse, **des études visant à rechercher la présence d'isoformes racinaires de WSCPs seront conduites aux stades végétatif et reproducteur chez des colzas cultivés en conditions de forte et faible disponibilités en N**. Si leur rôle racinaire est confirmé, l'expression de ces WSCP pourra être analysée chez des colzas présentent des ERA racinaires contrastées (Gironde et al. 2015). *In fine*, ces WSCPs pourraient constituer encore une fois des candidats particulièrement pertinents pour la sélection variétale chez le colza.

C. Conclusion

Pour conclure, ce travail de recherche confirme l'importance des systèmes protéolytiques et anti-protéolytiques comme leviers d'amélioration de l'EUA. Au cours de cette thèse, nous nous sommes concentrés sur un acteur majeur de chacun de ces deux systèmes.

Nos travaux ont ainsi permis de mieux cerner le rôle fonctionnel majeur et central de la protéase SAG12 sur la remobilisation de l'N depuis les feuilles et les racines afin d'assurer le remplissage des graines lors de la sénescence. Ce rôle pourrait être assuré en lien étroit avec une autre protéase, AED1 (CND41-like). Ces travaux ont aussi permis de montrer que la protéase SAG12 était indispensable pour répondre à la carence en N en participant notamment à la remobilisation de l'N depuis les racines. Ce dernier résultat, original, donne un éclairage nouveau sur le rôle des racines dans la réponse à la carence en N et ouvre des perspectives nouvelles pour la sélection de variétés plus efficientes dans un contexte souhaité de réduction des intrants azotés.

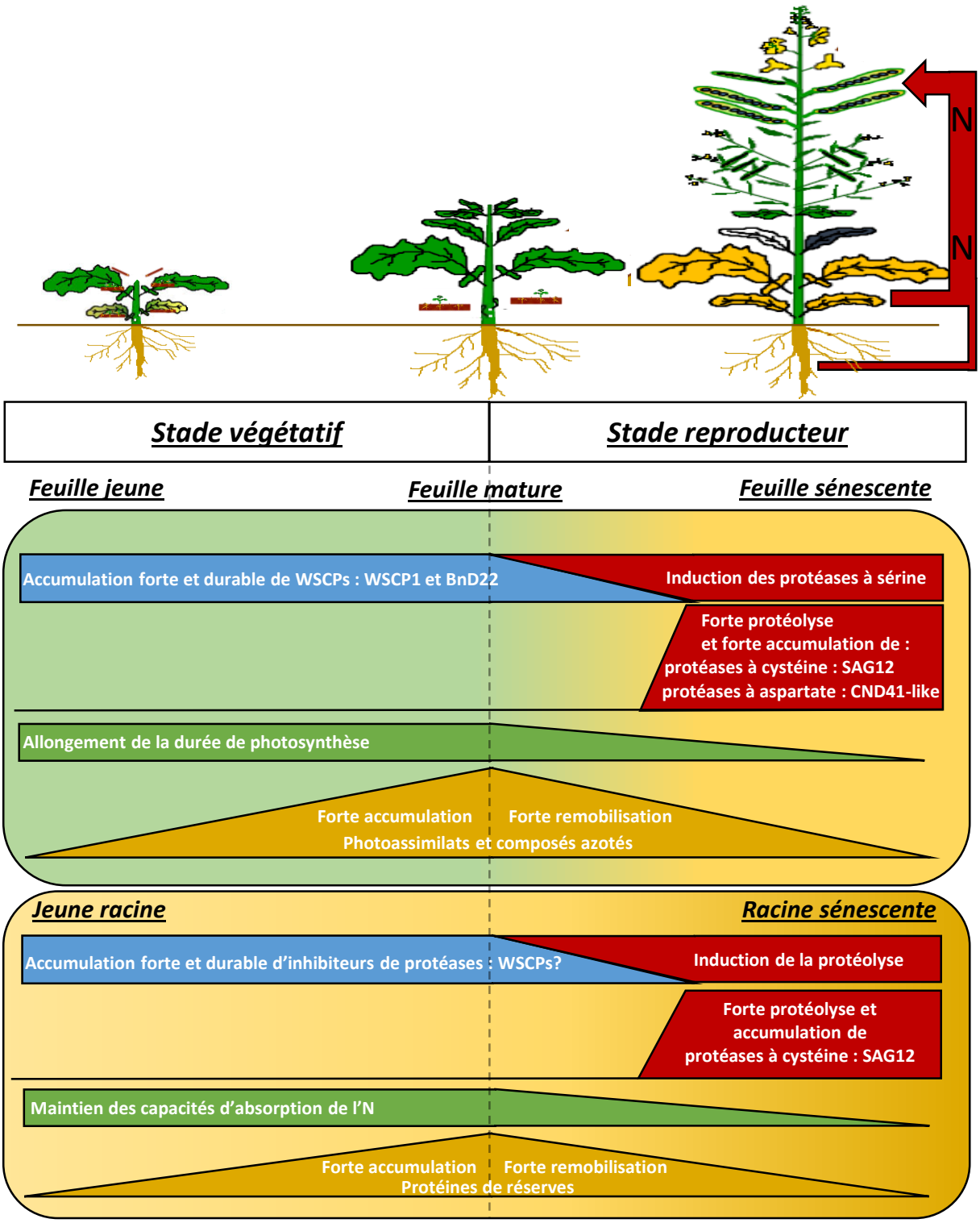


Fig. V.3. **Idéotype de colza pour la gestion de l'N en comparaison à un colza de type sauvage**

Ces travaux se sont également focalisés sur un acteur du système anti-protéolytique, la protéine WSCP1, et ont permis de largement suspecter sa double fonction et donc sa capacité à ralentir l'évolution de la sénescence en protégeant les chlorophylles et en inhibant les SPs. Une plus forte expression de la protéine WSCP1 pourrait alors permettre un allongement de la durée de vie des feuilles permettant une plus forte accumulation des composés carbonés et azotés, et ainsi une remobilisation plus abondante de l'N vers les graines lors de la sénescence. Ces travaux renforcent l'intérêt d'étudier ces acteurs capables de moduler la protéolyse et donc *in fine,* d'améliorer l'EUA.

Finalement, l'ensemble de ces travaux permet de proposer un idéotype de colza (**Fig. V.3**). Celui-ci présenterait dans ses feuilles tout au long du stade végétatif, une forte teneur en WSCPs (WSCP1 et BnD22) afin d'augmenter la durée de vie de ses feuilles et donc la durée de la photosynthèse permettant ainsi d'accumuler des quantités plus importantes de photoassimilats et de composés azotés. Au stade reproducteur, ce colza idéal devrait remobiliser l'ensemble de ces éléments pour assurer le remplissage des graines, et pour cela, combiner à une répression foliaire de l'expression de WSCP1 de fortes inductions foliaires des activités protéolytiques (notamment SAG12 et AED1). Conjointement à ce qui se passe dans les feuilles, les racines accumuleraient des inhibiteurs de protéases (WSCP par exemple) et auraient une durée de vie allongée permettant un meilleur stockage de protéines de réserves. Lorsque la plante arrivera au stade reproducteur et qu'elle devra remplir en N ses graines, l'activité inhibitrice pourrait chuter concomitamment avec l'induction de la protéolyse afin de permettre une plus forte remobilisation de l'N contenu dans les protéines de réserves.

Ce colza aurait donc la faculté de pouvoir mieux répondre à la contrainte azotée grâce à sa capacité à établir des réserves protéiques plus importantes, mais aussi à les mobiliser plus activement grâce à des activités protéolytiques optimisées, permettant ainsi une remobilisation d'N plus performante depuis les tissus sources au profit des tissus puits et plus particulièrement des graines.

CHAPITRE VI

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

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

Adam Z, Adamska I, Nakabayashi K, *et al.* 2001. Chloroplast and mitochondrial proteases in Arabidopsis. A proposed nomenclature. Plant Physiology **125**, 1912–1918.

Adam Z, Zaltsman A, Sinvany-Villalobo G, Sakamoto W. 2005. FtsH proteases in chloroplasts and cyanobacteria. Physiologia Plantarum **123**, 386–390.

Annamalai P, Yanagihara S. 1999. Identification and characterization of a heat-stress induced gene in cabbage Encodes a Künitz type protease inhibitor. Journal of Plant Physiology **155**, 226–233.

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

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

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

B

Balazadeh S, Schildhauer J, Araújo WL, Munné-Bosch S, Fernie AR, Proost S, Humbeck K, Mueller-Roeber B. 2014. Reversal of senescence by N resupply to N-starved Arabidopsis thaliana: transcriptomic and metabolomic consequences. Journal of Experimental Botany **65**, 3975–3992.

Balint T, Rengel Z. 2011. Nitrogen and sulfur uptake and remobilisation in canola genotypes with varied N- and S-use efficiency differ at vegetative and maturity stages. Crop and Pasture Science **62**, 299–312.

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

Beers EP, Jones AM, Dickerman AW. 2004. The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in Arabidopsis. Phytochemistry **65**, 43–58.

Beers EP, Woffenden BJ, Zhao C. 2000. Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. Plant Molecular Biology **44**, 399–415.

Bellegarde F, Gojon A, Martin A. 2017. Signals and players in the transcriptional regulation of root responses by local and systemic N signaling in Arabidopsis thaliana. Journal of Experimental Botany **68**, 2553–2565.

Berry PM, Spink J, Foulkes MJ, White PJ. 2010. The physiological basis of genotypic differences in nitrogen use efficiency in oilseed rape (*Brassica napus* L.). Field Crops Research **119**, 365–373.

Bhalerao R, Keskitalo J, Sterky F, *et al.* 2003. Gene Expression in Autumn Leaves. Plant Physiology **131**, 430–442.

Boex-Fontvieille E, Rustgi S, von Wettstein D, Reinbothe S, Reinbothe C. 2015. Water-soluble chlorophyll protein is involved in herbivore resistance activation during greening of *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **112**, 7303–7308.

Bollhöner B, Zhang B, Stael S, Denancé N, Overmyer K, Goffner D, Van Breusegem F, Tuominen H. 2013. Post mortem function of AtMC9 in xylem vessel elements. New Phytologist **200**, 498–510.

Bouchet A-S, Laperche A, Bissuel-Belaygue C, Snowdon R, Nesi N, Stahl A. 2016. Nitrogen use efficiency in rapeseed. A review. Agronomy for Sustainable Development **36**.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry **72**, 248–254.

Breeze E, Harrison E, McHattie S, *et al.* 2011. High-resolution temporal profiling of transcripts during Arabidopsis leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. The Plant Cell **23**, 873–894.

Buchanan-Wollaston V. 1997. The molecular biology of leaf senescence. Journal of Experimental Botany **48**, 181–199.

Buchanan-Wollaston V, Ainsworth C. 1996. Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation. Plant Molecular Biology **33**, 821–834.

Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, Pink D. 2003. The molecular analysis of leaf senescence – a genomics approach. Plant Biotechnology Journal **1**, 3–22.

Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, *et al.* 2005. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology **42**, 567–585.

C

Carrión CA, Costa ML, Martínez DE, Mohr C, Humbeck K, Guiamet JJ. 2013. In vivo inhibition of cysteine proteases provides evidence for the involvement of 'senescence-associated vacuoles' in chloroplast protein degradation during dark-induced senescence of tobacco leaves. Journal of Experimental Botany **64**, 4967–4980.

Carrión CA, Martínez DE, Costa ML, Guiamet JJ. 2014. Senescence-Associated Vacuoles, a specific lytic compartment for degradation of chloroplast proteins? Plants **3**, 498–512.

Cartelat A, Cerovic ZG, Goulas Y, *et al.* 2005. Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). Field Crops Research **91**, 35–49.

Chalhoub B, Denoeud F, Liu S, *et al.* 2014. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. Science **345**, 950–953.

Chauhan S, Srivalli S, Nautiyal AR, Khanna-Chopra R. 2009. Wheat cultivars differing in heat tolerance show a differential response to monocarpic senescence under high-temperature stress and the involvement of serine proteases. Photosynthetica **47**, 536–547.

Chen J, Burke JJ, Velten J, Xin Z. 2006. FtsH11 protease plays a critical role in Arabidopsis thermotolerance. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology **48**, 73–84.

Chen M, Maodzeka A, Zhou L, Ali E, Wang Z, Jiang L. 2014. Removal of DELLA repression promotes leaf senescence in Arabidopsis. Plant Science **219–220**, 26–34.

Chen L, Xiang S, Chen Y, Li D, Yu D. 2017. Arabidopsis WRKY45 interacts with the DELLA protein RGL1 to positively regulate age-triggered leaf senescence. Molecular Plant **10**, 1174–1189.

Chi W, Sun X, Zhang L. 2012. The roles of chloroplast proteases in the biogenesis and maintenance of photosystem II. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1817**, 239–246.

Chiba A, Ishida H, Nishizawa NK, Makino A, Mae T. 2003. Exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. Plant & Cell Physiology **44**, 914–921.

Chichkova NV, Shaw J, Galiullina RA, *et al.* 2010. Phytaspase, a relocalisable cell death promoting plant protease with caspase specificity. The EMBO Journal **29**, 1149–1161.

Cho K, Mabasa L, Fowler AW, Walsh DM, Park CS. 2010. Canola oil inhibits breast cancer cell growth in cultures and in vivo and acts synergistically with chemotherapeutic drugs. Lipids **45**, 777–784.

Chouard P. 1960. Vernalization and its relations to dormancy. Annual Review of Plant Physiology **11**, 191–238.

Chrobok D, Law SR, Brouwer B, *et al.* 2016. Dissecting the metabolic role of mitochondria during developmental leaf senescence. Plant Physiology **172**, 2132–2153.

Clough SJ, Bent AF. 1998. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology **16**, 735–743.

Colnenne C, Meynard JM, Reau R, Justes E, Merrien A. 1998. Determination of a critical nitrogen dilution curve for winter oilseed rape. Annals of Botany **81**, 311–317.

Coupe SA, Sinclair BK, Watson LM, Heyes JA, Eason JR. 2003. Identification of dehydration-responsive cysteine proteases during post-harvest senescence of broccoli florets. Journal of Experimental Botany **54**, 1045–1056.

Crawford NM, Forde BG. 2002. Molecular and Developmental Biology of Inorganic Nitrogen Nutrition. The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists **1**.

Crawford NM, Glass ADM. 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. Trends in Plant Science **3**, 389–395.

Curci PL, Aiese Cigliano R, Zuluaga DL, Janni M, Sanseverino W, Sonnante G. 2017. Transcriptomic response of durum wheat to nitrogen starvation. Scientific Reports **7**.

D

Dai N, Schaffer A, Petreikov M, Shahak Y, Giller Y, Ratner K, Levine A, Granot D. 1999. Overexpression of Arabidopsis hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. The Plant Cell **11**, 1253–1266.

Damaraju S, Schlede S, Eckhardt U, Lokstein H, Grimm B. 2011. Functions of the water soluble chlorophyll-binding protein in plants. Journal of Plant Physiology **168**, 1444–1451.

Dawson JC, Huggins DR, Jones SS. 2008. Characterizing nitrogen use efficiency in natural and agricultural ecosystems to improve the performance of cereal crops in low-input and organic agricultural systems. Field Crops Research **107**, 89–101.

Dejoux J-F, Recous S, Meynard J-M, Trinsoutrot I, Leterme P. 2000. The fate of nitrogen from winter-frozen rapeseed leaves: mineralization, fluxes to the environment and uptake by rapeseed crop in spring. Plant and Soil **218**, 257–272.

Delorme VGR, McCabe PF, Kim D-J, Leaver CJ. 2000. A matrix metalloproteinase gene is expressed at the boundary of senescence and programmed cell death in cucumber. Plant Physiology **123**, 917–928.

Desclos M, Dubousset L, Etienne P, Le Caherec F, Satoh H, Bonnefoy J, Ourry A, Avice J-C. 2008. A proteomic profiling approach to reveal a novel role of *Brassica napus* Drought 22 kD/water-soluble chlorophyll-binding protein in young leaves during nitrogen remobilization induced by stressful conditions. Plant Physiology **147**, 1830–1844.

Desclos M, Etienne P, Coquet L, Jouenne T, Bonnefoy J, Segura R, Reze S, Ourry A, Avice J-C. 2009. A combined 15N tracing/proteomics study in *Brassica napus* reveals the chronology of proteomics events associated with N remobilisation during leaf senescence induced by nitrate limitation or starvation. PROTEOMICS **9**, 3580–3608.

Desclos-Théveniau M, Coquet L, Jouenne T, Etienne P. 2015. Proteomic analysis of residual proteins in blades and petioles of fallen leaves of *Brassica napus*. Plant Biology **17**, 408–418.

D'Hooghe P, Dubousset L, Gallardo K, Kopriva S, Avice J-C, Trouverie J. 2014. Evidence for proteomic and metabolic adaptations associated with alterations of seed yield and quality in sulfur-limited *Brassica napus* L. Molecular & cellular proteomics: MCP **13**, 1165–1183.

Diaz C, Lemaître T, Christ A, Azzopardi M, Kato Y, Sato F, Morot-Gaudry J-F, Dily FL, Masclaux-Daubresse C. 2008. Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in Arabidopsis under low nitrogen nutrition. Plant Physiology **147**, 1437–1449.

Diaz C, Purdy S, Christ A, Morot-Gaudry J-F, Wingler A, Masclaux-Daubresse C. 2005. Characterization of markers to determine the extent and variability of leaf senescence in Arabidopsis. A metabolic profiling approach. Plant Physiology **138**, 898–908.

Diaz-Mendoza M, Velasco-Arroyo B, Santamaria ME, González-Melendi P, Martinez M, Diaz I. 2016. Plant senescence and proteolysis: two processes with one destiny. Genetics and Molecular Biology **39**, 329–338.

Dominguez F, Cejudo FJ. 1996. Characterization of the endoproteases appearing during wheat grain development. Plant Physiology **112**, 1211–1217.

Downing WL, Mauxion F, Fauvarque M-O, Reviron M-P, Vienne DD, Vartanian N, Giraudat J. 1992. A *Brassica napus* transcript encoding a protein related to the Künitz protease inhibitor family accumulates upon water stress in leaves, not in seeds. The Plant Journal **2**, 685–693.

Dubousset L, Abdallah M, Desfeux AS, *et al.* 2009. Remobilization of leaf S compounds and senescence in response to restricted sulphate supply during the vegetative stage of oilseed rape are affected by mineral N availability. Journal of Experimental Botany **60**, 3239–3253.

E

Escamez S, André D, Zhang B, Bollhöner B, Pesquet E, Tuominen H. 2016. METACASPASE9 modulates autophagy to confine cell death to the target cells during Arabidopsis vascular xylem differentiation. Biology Open, bio.015529.

Etienne P, Desclos M, Gou LL, Gombert J, Bonnefoy J, Maurel K, Dily FL, Ourry A, Avice J-C. 2007. N-protein mobilisation associated with the leaf senescence process in oilseed rape is concomitant with the disappearance of trypsin inhibitor activity. Functional Plant Biology **34**, 895–906.

Evans JR. 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. Oecologia **78**, 9–19.

F

Fan X, Feng H, Tan Y, Xu Y, Miao Q, Xu G. 2016*a*. A putative 6-transmembrane nitrate transporter OsNRT1.1b plays a key role in rice under low nitrogen. Journal of Integrative Plant Biology **58**, 590–599.

Fan X, Tang Z, Tan Y, Zhang Y, Luo B, Yang M, Lian X, Shen Q, Miller AJ, Xu G. 2016*b*. Overexpression of a pH-sensitive nitrate transporter in rice increases crop yields. Proceedings of the National Academy of Sciences **113**, 7118–7123.

Feng H, Li B, Zhi Y, Chen J, Li R, Xia X, Xu G, Fan X. 2017. Overexpression of the nitrate transporter, OsNRT2.3b, improves rice phosphorus uptake and translocation. Plant Cell Reports **36**, 1287–1296.

Flinn BS. 2008. Plant extracellular matrix metalloproteinases. Functional Plant Biology **35**, 1183–1193.

Fuentes SI, Allen DJ, Ortiz-Lopez A, Hernández G. 2001. Over-expression of cytosolic glutamine synthetase increases photosynthesis and growth at low nitrogen concentrations. Journal of Experimental Botany **52**, 1071–1081.

G

Gan S, Amasino RM. 1297. Making Sense of Senescence (Molecular Genetic Regulation and Manipulation of Leaf Senescence). Plant Physiology **113**, 313–319.

Gan S, Amasino RM. 1995. Inhibition of Leaf Senescence by Autoregulated Production of Cytokinin. Science **270**, 1986–1988.

Gan S, Amasino RM. 1997. Making Sense of Senescence (Molecular Genetic Regulation and Manipulation of Leaf Senescence). Plant Physiology **113**, 313–319.

Gent L, Forde BG. 2017. How do plants sense their nitrogen status? Journal of Experimental Botany **68**, 2531–2539.

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**, 695.

Girondé A, Etienne P, Trouverie J, *et al.* 2015*a*. 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.

Girondé A, Poret M, Etienne P, *et al.* 2015*b*. A profiling approach of the natural variability of foliar N remobilization at the rosette stage gives clues to understand the limiting processes involved in the low N use efficiency of winter oilseed rape. Journal of Experimental Botany **66**, 2461–2473.

Girondé A, Poret M, Etienne P, Trouverie J, Bouchereau A, Le Cahérec F, Leport L, Niogret M-F, Avice J-C. 2016. A Comparative Study of Proteolytic Mechanisms during Leaf Senescence of Four Genotypes of Winter Oilseed Rape Highlighted Relevant Physiological and Molecular Traits for NRE Improvement. Plants **5**, 1.

Golldack D, Popova OV, Dietz K-J. 2002. Mutation of the matrix metalloproteinase At2-MMP inhibits growth and causes late flowering and early senescence in Arabidopsis. The Journal of Biological Chemistry **277**, 5541–5547.

Gombert J, Dily FL, Lothier J, Etienne P, Rossato L, Allirand J-M, Jullien A, Savin A, Ourry A. 2010. Effect of nitrogen fertilization on nitrogen dynamics in oilseed rape using 15N-labeling field experiment. Journal of Plant Nutrition and Soil Science **173**, 875–884.

Gombert J, Etienne P, Ourry A, Dily FL. 2006. The expression patterns of SAG12/Cab genes reveal the spatial and temporal progression of leaf senescence in *Brassica napus* L. with sensitivity to the environment. Journal of Experimental Botany **57**, 1949–1956.

Good AG, Johnson SJ, De Pauw M, Carroll RT, Savidov N, Vidmar J, Lu Z, Taylor G, Stroeher V. 2007. Engineering nitrogen use efficiency with alanine aminotransferase. Canadian Journal of Botany **85**, 252–262.

Good AG, Shrawat AK, Muench DG. 2004. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? Trends in Plant Science **9**, 597–605.

Grbić V. 2002. Spatial expression pattern of SAG12:GUS transgene in tobacco (*Nicotiana tabacum*). Physiologia Plantarum **116**, 416–422.

Grbić V. 2003. SAG2 and SAG12 protein expression in senescing Arabidopsis plants. Physiologia Plantarum **119**, 263–269.

Greenbaum DC, Baruch A, Grainger M, Bozdech Z, Medzihradszky KF, Engel J, DeRisi J, Holder AA, Bogyo M. 2002. A Role for the Protease Falcipain 1 in Host Cell Invasion by the Human Malaria Parasite. Science **298**, 2002–2006.

Gregersen PL. 2011. Senescence and nutrient remobilization in crop plants. The Molecular and Physiological Basis of Nutrient Use Efficiency in Crops. Wiley-Blackwell, 83–102.

Gregersen PL, Culetic A, Boschian L, Krupinska K. 2013. Plant senescence and crop productivity. Plant Molecular Biology **82**, 603–622.

Gregersen PL, Holm PB. 2007. Transcriptome analysis of senescence in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Biotechnology Journal **5**, 192–206.

Guiboileau A, Avila-Ospina L, Yoshimoto K, Soulay F, Azzopardi M, Marmagne A, Lothier J, Masclaux-Daubresse C. 2013. Physiological and metabolic consequences of autophagy deficiency for the management of nitrogen and protein resources in Arabidopsis leaves depending on nitrate availability. The New Phytologist **199**, 683–694.

Guiboileau A, Sormani R, Meyer C, Masclaux-Daubresse C. 2010. Senescence and death of plant organs: Nutrient recycling and developmental regulation. Comptes Rendus Biologies **333**, 382–391.

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. The New Phytologist **194**, 732–740.

Guo Y, Cai Z, Gan S. 2004. Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence. Plant, Cell & Environment **27**, 521–549.

Guo Y, Gan S. 2005. Leaf senescence: signals, execution, and regulation. Current Topics in Developmental Biology **71**, 83–112.

Guo Y, Gan S. 2006. AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology **46**, 601–612.

H

Habash DZ, Massiah AJ, Rong HL, Wallsgrove RM, Leigh RA. 2006. The role of cytosolic glutamine synthetase in wheat. Annals of Applied Biology **138**, 83–89.

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**.

Hara-Nishimura I, Hatsugai N. 2011. The role of vacuole in plant cell death. Cell Death and Differentiation **18**, 1298–1304.

Havé M, Balliau T, Cottyn-Boitte B, *et al.* 2018. Increases in activity of proteasome and papain-like cysteine protease in Arabidopsis autophagy mutants: back-up compensatory effect or cell-death promoting effect? Journal of Experimental Botany **69**, 1369–1385.

He H, Yang R, Li Y, Ma A, Cao L, Wu X, Chen B, Tian H, Gao Y. 2017. Genotypic variation in nitrogen utilization efficiency of oilseed rape (*Brassica napus*) under contrasting N supply in pot and field experiments. Frontiers in Plant Science **8**.

van der Hoorn RAL. 2008. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. Annual Review of Plant Biology **59**, 191–223.

van der Hoorn RAL, Kaiser M. 2012. Probes for activity-based profiling of plant proteases. Physiologia Plantarum **145**, 18–27.

van der Hoorn RAL, Leeuwenburgh MA, Bogyo M, Joosten MHAJ, Peck SC. 2004. Activity profiling of papain-like cysteine proteases in plants. Plant Physiology **135**, 1170–1178.

Horigome D, Satoh H, Itoh N, Mitsunaga K, Oonishi I, Nakagawa A, Uchida A. 2007. Structural mechanism and photoprotective function of water-soluble chlorophyll-binding Protein. Journal of Biological Chemistry **282**, 6525–6531.

Hörtensteiner S, Feller U. 2002. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. Journal of Experimental Botany **53**, 927–937.

Hu M, Zhao X, Liu Q, Hong X, Zhang W, Zhang Y, Sun L, Li H, Tong Y. 2018. Transgenic expression of plastidic glutamine synthetase increases nitrogen uptake and yield in wheat. Plant Biotechnology Journal **0**.

Hung S., Umemura T., Yamashiro S., Slinger S. J., Holub B. J. 1977. The effects of original and randomized rapeseed oils containing high or very low levels of erucic acid on cardiac lipids and myocardial lesions in rats. Lipids **12**, 215–221.

Hunková E, Živčák M, Olšovská K. 2011. Leaf area duration of oilseed rape (*Brassica napus subsp. napus*) varieties and hybrids and its relationship to selected growth and productivity parameters. Journal of Central European Agriculture.

Hwang I, Sheen J, Müller B. 2012. Cytokinin signaling networks. Annual Review of Plant Biology **63**, 353–380.

I

Ilami G, Nespoulous C, Huet J-C, Vartanian N, Pernollet J-C. 1997. Characterization of BnD22, a drought-induced protein expressed in *Brassica napus* leaves. Phytochemistry **45**, 1–8.

Ishida H, Izumi M, Wada S, Makino A. 2014. Roles of autophagy in chloroplast recycling. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1837**, 512–521.

Ishida H, Yoshimoto K, Izumi M, Reisen D, Yano Y, Makino A, Ohsumi Y, Hanson MR, Mae T. 2008. Mobilization of RuBisCO and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. Plant Physiology **148**, 142–155.

J

Jackson GD. 2000. Effects of nitrogen and sulfur on canola yield and nutrient uptake. Agronomy Journal **92**, 644–649.

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 mobilization during senescence for seed production in Arabidopsis thaliana. Plant & Cell Physiology.

Jamont M, Piva G, Fustec J. 2013. Sharing N resources in the early growth of rapeseed intercropped with faba bean: does N transfer matter? Plant and Soil **371**, 641–653.

Janska H, Piechota J, Kwasniak M. 2010. ATP-dependent proteases in biogenesis and maintenance of plant mitochondria. Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics **1797**, 1071–1075.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The EMBO Journal **6**, 3901–3907.

Jehanzeb M, Zheng X, Miao Y. 2017. The Role of the S40 Gene Family in Leaf Senescence. International Journal of Molecular Sciences **18**.

Jing H-C, Schippers JHM, Hille J, Dijkwel PP. 2005. Ethylene-induced leaf senescence depends on age-related changes and OLD genes in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany **56**, 2915–2923.

Juśko AK, Kościk B. 2002. Possible use of the chlorophyll meter (SPAD-502) for evaluating nitrogen nutrition of the Virginia tobacco. Electronic journal of polish agricultural universities **5**.

K

Kato Y, Murakami S, Yamamoto Y, Chatani H, Kondo Y, Nakano T, Yokota A, Sato F. 2004. The DNA-binding protease, CND41, and the degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in senescent leaves of tobacco. Planta **220**, 97–104.

Kato Y, Sakamoto W. 2009. Protein quality control in chloroplasts: A current model of D1 protein degradation in the photosystem II repair cycle. The Journal of Biochemistry **146**, 463–469.

Kato Y, Sakamoto W. 2010. New insights into the types and function of proteases in plastids. International Review of Cell and Molecular Biology **280**, 185–218.

Kato Y, Yamamoto Y, Murakami S, Sato F. 2005. Post-translational regulation of CND41 protease activity in senescent tobacco leaves. Planta **222**, 643–651.

Kempema LA, Cui X, Holzer FM, Walling LL. 2007. Arabidopsis transcriptome changes in response to phloem-feeding silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids. Plant Physiology **143**, 849–865.

Khan M, Rozhon W, Poppenberger B. 2014. The role of hormones in the aging of plants. Gerontology **60**, 49–55.

Kinoshita T, Yamada K, Hiraiwa N, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. 1999. Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology **19**, 43–53.

Köllner B, Krause GHM. 2003. Effects of two different ozone exposure regimes on chlorophyll and sucrose content of leaves and yield parameters of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and Rape (*Brassica napus* L.). Water, Air, and Soil Pollution **144**, 317–332.

Kolodziejek I, Misas-Villamil JC, Kaschani F, *et al.* 2011. Proteasome activity imaging and profiling characterizes bacterial effector syringolin A. Plant Physiology **155**, 477–489.

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.

Kusaba M, Tanaka A, Tanaka R. 2013. Stay-green plants: what do they tell us about the molecular mechanism of leaf senescence. Photosynthesis Research **117**, 221–234.

Kwasniak M, Pogorzelec L, Migdal I, Smakowska E, Janska H. 2012. Proteolytic system of plant mitochondria. Physiologia Plantarum **145**, 187–195.

Kwon SI, Hwang DJ. 2013. Expression analysis of the metacaspase gene family in Arabidopsis. Journal of Plant Biology **56**, 391–398.

L

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**, 680.

Lainé P, Ourry A, Macduff J, Boucaud J, Salette J. 1993. Kinetic parameters of nitrate uptake by different catch crop species: effects of low temperatures or previous nitrate starvation. Physiologia Plantarum **88**, 85–92.

Lam E. 2005. Vacuolar proteases livening up programmed cell death. Trends in Cell Biology **15**, 124–127.

Lassaletta L, Billen G, Grizzetti B, Anglade J, Garnier J. 2014. 50 year trends in nitrogen use efficiency of world cropping systems: the relationship between yield and nitrogen input to cropland. Environmental Research Letters **9**, 105011.

Lemaire G, Durand J-L, Lila M. 1989. Effet de la sécheresse sur la digestibilité in vitro, la teneur en ADF et la teneur en azote de la luzerne (Medicago sativa L.). Agronomie **9**, 841–848.

Lequeu J, Simon-Plas F, Fromentin J, Etienne P, Petitot A-S, Blein J-P, Suty L. 2005. Proteasome comprising a β1 inducible subunit acts as a negative regulator of NADPH oxidase during elicitation of plant defense reactions. FEBS Letters **579**, 4879–4886.

Li W, Zhang H, Li X, *et al.* 2017. Intergrative metabolomic and transcriptomic analyses unveil nutrient remobilization events in leaf senescence of tobacco. Scientific Reports **7**, 12126.

Lim PO, Kim HJ, Nam HG. 2007. Leaf Senescence. Annual Review of Plant Biology **58**, 115–136.

Lin J-F, Wu S-H. 2004. Molecular events in senescing Arabidopsis leaves. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology **39**, 612–628.

Liu L, Zhou Y, Zhou G, Ye R, Zhao L, Li X, Lin Y. 2008. Identification of early senescence-associated genes in rice flag leaves. Plant Molecular Biology **67**, 37–55.

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.

Lohman KN, Gan S, John MC, Amasino RM. 1994. Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. Physiologia Plantarum **92**, 322–328.

Loudet O, Chaillou S, Camilleri C, Bouchez D, Daniel-Vedele F. 2002. Bay-0 x Shahdara recombinant inbred line population: a powerful tool for the genetic dissection of complex traits in Arabidopsis. TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik **104**, 1173–1184.

Lu H, Chandrasekar B, Oeljeklaus J, Misas-Villamil JC, Wang Z, Shindo T, Bogyo M, Kaiser M, van der Hoorn RAL. 2015. Subfamily-specific fluorescent probes for cysteine proteases display dynamic protease activities during seed germination. Plant Physiology **168**, 1462–1475.

Luciński R, Misztal L, Samardakiewicz S, Jackowski G. 2011*a*. Involvement of Deg5 protease in wounding-related disposal of PsbF apoprotein. Plant Physiology and Biochemistry **49**, 311–320.

Luciński R, Misztal L, Samardakiewicz S, Jackowski G. 2011*b*. The thylakoid protease Deg2 is involved in stress-related degradation of the photosystem II light-harvesting protein Lhcb6 in *Arabidopsis thaliana*. The New Phytologist **192**, 74–86.

M

Malagoli P, Lainé P, Le Deunff E, Rossato L, Ney B, Ourry A. 2004. Modeling nitrogen uptake in oilseed rape cv Capitol during a growth cycle using influx kinetics of root nitrate transport systems and field experimental data. Plant Physiology **134**, 388–400.

Malagoli P, Laine P, Rossato L, Ourry A. 2005*a*. Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to Hharvest I. global N flows between vegetative and reproductive tissues in relation to leaf fall and their residual N. Annals of Botany **95**, 853–861.

Malagoli P, Lainé P, Rossato L, Ourry A. 2005*b*. Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) From stem extension to harvest. II. An 15N-labelling-based simulation model of N partitioning between vegetative and reproductive tissues. Annals of Botany **95**, 1187–1198.

Marino G, Funk C. 2011. Matrix metalloproteinases in plants: a brief overview. Physiologia Plantarum **145**, 196–202.

Martínez DE, Bartoli CG, Grbic V, Guiamet JJ. 2007. Vacuolar cysteine proteases of wheat (*Triticum aestivum* L.) are common to leaf senescence induced by different factors. Journal of Experimental Botany **58**, 1099–1107.

Martinez DE, Borniego ML, Battchikova N, Aro E-M, Tyystjärvi E, Guiamét JJ. 2015. SASP, a Senescence-Associated Subtilisin Protease, is involved in reproductive development and determination of silique number in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany **66**, 161–174.

Martínez DE, Costa ML, Gomez FM, Otegui MS, Guiamet JJ. 2008. 'Senescence-associated vacuoles' are involved in the degradation of chloroplast proteins in tobacco leaves. The Plant Journal **56**, 196–206.

Martínez DE, Guiamet JJ. 2014. Senescence-related changes in the leaf apoplast. Journal of Plant Growth Regulation **33**, 44–55.

Masclaux C, Valadier M-H, Brugière N, Morot-Gaudry J-F, Hirel B. 2000. Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. Planta **211**, 510–518.

Masclaux-Daubresse C, Chen Q, Havé M. 2017. Regulation of nutrient recycling via autophagy. Current Opinion in Plant Biology **39**, 8–17.

Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A. 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. Annals of Botany **105**, 1141–1157.

Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Orsel M. 2008. Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. Plant Biology (Stuttgart, Germany) **10 Suppl 1**, 23–36.

McAllister CH, Wolansky M, Good AG. 2016. The impact on nitrogen-efficient phenotypes when aspartate aminotransferase is expressed tissue-specifically in *Brassica napus*. New Negatives in Plant Science **3–4**, 1–9.

Merrien A, Pouzet A. 1988. Principaux facteurs limitant les rendements de colza d'hiver dans les conditions française Physiologie et élaboration du rendement du colza d'hiver.16-22.

Miao Y, Laun T, Zimmermann P, Zentgraf U. 2004. Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in Arabidopsis. Plant Molecular Biology **55**, 853–867.

Michaeli S, Honig A, Levanony H, Peled-Zehavi H, Galili G. 2014. Arabidopsis ATG8-INTERACTING PROTEIN1 is involved in autophagy-dependent vesicular trafficking of plastid proteins to the vacuole. The Plant Cell **26**, 4084–4101.

Migge A, Carrayol E, Hirel B, Becker TW. 2000. Leaf-specific overexpression of plastidic glutamine synthetase stimulates the growth of transgenic tobacco seedlings. Planta **210**, 252–260.

Moon J, Parry G, Estelle M. 2004. The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. The Plant Cell **16**, 3181–3195.

Morris K, A. -H. -Mackerness S, Page T, John CF, Murphy AM, Carr JP, Buchanan-Wollaston V. 2001. Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. The Plant Journal **23**, 677–685.

Mosolov VV, Valueva TA. 2005. Proteinase inhibitors and their function in plants: A review. Applied Biochemistry and Microbiology **41**, 227–246.

Muñoz-Huerta R, Guevara-Gonzalez R, Contreras-Medina L, Torres-Pacheco I, Prado-Olivarez J, Ocampo-Velazquez R. 2013. A review of methods for sensing the nitrogen status in plants: advantages, disadvantages and recent advances. Sensors **13**, 10823–10843.

Murakami S, Kondo Y, Nakano T, Sato F. 2000. Protease activity of CND41, a chloroplast nucleoid DNA-binding protein, isolated from cultured tobacco cells. FEBS Letters **468**, 15–18.

Murata T, Toda F, Uchino K, Yakushiji E. 1971. Water-soluble chlorophyll protein of *Brassica oleracea var. Botrys* (cauliflower). Biochimica Et Biophysica Acta **245**, 208–215.

N

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.

Nakano T, Murakami S, Shoji T, Yoshida S, Yamada Y, Sato F. 1997. A novel protein with DNA binding activity from tobacco chloroplast nucleoids. The Plant Cell **9**, 1673–1682.

Nesi N, Delourme R, Brégeon M, Falentin C, Renard M. 2008. Genetic and molecular approaches to improve nutritional value of *Brassica napus* L. seed. Comptes Rendus Biologies **331**, 763–771.

Newman GR. 1987. Use and abuse of LR White. The Histochemical Journal **19**, 118–120.

Nishimura M, Hayashi M, Kato A, Yamaguchi K, Mano S. 1996. Functional transformation of microbodies in higher plant cells. Cell Structure and Function **21**, 387–393.

Noh YS, Amasino RM. 1999*a*. Regulation of developmental senescence is conserved between Arabidopsis and *Brassica napus*. Plant Molecular Biology **41**, 195–206.

Noh Y-S, Amasino RM. 1999*b*. Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of SAG12. Plant Molecular Biology **41**, 181–194.

Noquet C, Avice J-C, Rossato L, Beauclair P, Henry M-P, Ourry A. 2004. Effects of altered source–sink relationships on N allocation and vegetative storage protein accumulation in *Brassica napus* L. Plant Science **166**, 1007–1018.

Nyikako J, Schierholt A, Kessel B, Becker HC. 2014. Genetic variation in nitrogen uptake and utilization efficiency in a segregating DH population of winter oilseed rape. Euphytica **199**, 3–11.

O

Oh SA, Park J-H, Lee GI, Paek KH, Park SK, Nam HG. 2003. Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal **12**, 527–535.

Otegui MS. 2018. Vacuolar degradation of chloroplast components: autophagy and beyond. Journal of Experimental Botany **69**, 741–750.

Otegui MS, Noh Y-S, Martínez DE, Vila Petroff MG, Andrew Staehelin L, Amasino RM, Guiamet JJ. 2005. Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of Arabidopsis and soybean. The Plant Journal **41**, 831–844.

P

Pageau K, Reisdorf-Cren M, Morot-Gaudry J-F, Masclaux-Daubresse C. 2006. The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. Journal of Experimental Botany **57**, 547–557.

Pak C, Doorn WGV. 2005. Delay of Iris flower senescence by protease inhibitors. New Phytologist **165**, 473–480.

Parrott DL, Martin JM, Fischer AM. 2010. Analysis of barley (*Hordeum vulgare*) leaf senescence and protease gene expression: a family C1A cysteine protease is specifically induced under conditions characterized by high carbohydrate, but low to moderate nitrogen levels. The New Phytologist **187**, 313–331.

Parrott DL, McInnerney K, Feller U, Fischer AM. 2007. Steam-girdling of barley (*Hordeum vulgare*) leaves leads to carbohydrate accumulation and accelerated leaf senescence, facilitating transcriptomic analysis of senescence-associated genes. The New Phytologist **176**, 56–69.

Patricelli MP, Giang DK, Stamp LM, Burbaum JJ. 2001. Direct visualization of serine hydrolase activities in complex proteomes using fluorescent active site-directed probes. Proteomics **1**, 1067–1071.

Peoples MB, Dalling MJ. 1988. The interplay between proteolysis and amino acid metabolism during senescence and nitrogen reallocation.

Poret M. 2016. Caractérisation de la machinerie protéolytique associée à une remobilisation efficiente de l'azote pendant la sénescence dans le but d'optimiser l'efficience d'usage de l'azote chez le colza (*Brassica napus* L.).

Poret M, Chandrasekar B, van der Hoorn RAL, Avice J-C. 2016. Characterization of senescence-associated protease activities involved in the efficient protein remobilization during leaf senescence of winter oilseed rape. Plant Science **246**, 139–153.

Prins A, Heerden V, D.r P, Olmos E, Kunert KJ, Foyer CH. 2008. Cysteine proteinases regulate chloroplast protein content and composition in tobacco leaves: a model for dynamic interactions with ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) vesicular bodies. Journal of Experimental Botany **59**, 1935–1950.

Pružinská A, Shindo T, Niessen S, Kaschani F, Tóth R, Millar AH, van der Hoorn RAL. 2017. Major Cys protease activities are not essential for senescence in individually darkened Arabidopsis leaves. BMC Plant Biology **17**, 4.

Q

Quirino BF, Noh Y-S, Himelblau E, Amasino RM. 2000. Molecular aspects of leaf senescence. Trends in Plant Science **5**, 278–282.

R

Rahbé Y, Deraison C, Bonadé-Bottino M, Girard C, Nardon C, Jouanin L. 2003. Effects of the cysteine protease inhibitor oryzacystatin (OC-I) on different aphids and reduced performance of Myzus persicae on OC-I expressing transgenic oilseed rape. Plant Science **164**, 441–450.

Rathke G-W, Behrens T, Diepenbrock W. 2006. Integrated nitrogen management strategies to improve seed yield, oil content and nitrogen efficiency of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): A review. Agriculture, Ecosystems & Environment **117**, 80–108.

Rautengarten C, Steinhauser D, Büssis D, Stintzi A, Schaller A, Kopka J, Altmann T. 2005. Inferring hypotheses on functional relationships of genes: Analysis of the *Arabidopsis thaliana* subtilase gene family. PLOS Computational Biology **1**, e40.

Rawlings ND, Barrett AJ, Finn R. 2016. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Nucleic Acids Research **44**, D343-350.

Reinbothe C, Springer A, Samol I, Reinbothe S. 2009. Plant oxylipins: role of jasmonic acid during programmed cell death, defence and leaf senescence. The FEBS Journal **276**, 4666–4681.

Reviron MP, Vartanian N, Sallantin M, Huet JC, Pernollet JC, de Vienne D. 1992. Characterization of a novel protein induced by progressive or rapid drought and salinity in *Brassica napus* leaves. Plant Physiology **100**, 1486–1493.

Richau KH, Kaschani F, Verdoes M, Pansuriya TC, Niessen S, Stüber K, Colby T, Overkleeft HS, Bogyo M, Hoorn RALV der. 2012. Subclassification and biochemical analysis of plant papain-like cysteine proteases displays subfamily-specific characteristics.

Richmond AE, Lang A. 1957. Effect of kinetin on protein content and survival of detached xanthium leaves. Science **125**, 650–651.

Río LA del, Pastori GM, Palma JM, Sandalio LM, Sevilla F, Corpas FJ, Jiménez A, López-Huertas E, Hernández JA. 1998. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. Plant Physiology **116**, 1195–1200.

Roberts IN, Caputo C, Criado MV, Funk C. 2012. Senescence-associated proteases in plants. Physiologia Plantarum **145**, 130–139.

Roberts IN, Caputo C, Kade M, Criado MV, Barneix AJ. 2011. Subtilisin-like serine proteases involved in N remobilization during grain filling in wheat. Acta Physiologiae Plantarum **33**, 1997–2001.

Roberts I, Murray PF, Passeron S, Barneix AJ. 2002. The activity of the 20S proteasome is maintained in detached wheat leaves during senescence in darkness. Plant Physiology and Biochemistry **40**, 161–166.

Roberts IN, Passeron S, Barneix AJ. 2006. The two main endoproteases present in dark-induced senescent wheat leaves are distinct subtilisin-like proteases. Planta **224**, 1437–1447.

Roberts IN, Veliz CG, Criado MV, Signorini A, Simonetti E, Caputo C. 2017. Identification and expression analysis of 11 subtilase genes during natural and induced senescence of barley plants. Journal of Plant Physiology **211**, 70–80.

Rojo E, Zouhar J, Carter C, Kovaleva V, Raikhel NV. 2003. A unique mechanism for protein processing and degradation in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**, 7389–7394.

Rossato L, Lainé P, Ourry A. 2001. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. Journal of Experimental Botany **52**, 1655–1663.

Rossato L, MacDuff JH, Laine P, Le Deunff E, Ourry A. 2002. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: effects of methyl jasmonate on nitrate uptake, senescence, growth, and VSP accumulation. Journal of Experimental Botany **53**, 1131–1141.

Rouse JW. 1974. Monitoring vegetation systems in the Great Plains with ERTS.309–317.

Runeberg-Roos P, Saarma M. 1998. Phytepsin, a barley vacuolar aspartic proteinase, is highly expressed during autolysis of developing tracheary elements and sieve cells. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology **15**, 139–145.

Rustgi S, Boex-Fontvieille E, Reinbothe C, von Wettstein D, Reinbothe S. 2017*a*. Serpin1 and WSCP differentially regulate the activity of the cysteine protease RD21 during plant development in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **114**, 2212–2217.

Rustgi S, Boex-Fontvieille E, Reinbothe C, von Wettstein D, Reinbothe S. 2017*b*. The complex world of plant protease inhibitors: Insights into a Kunitz-type cysteine protease inhibitor of *Arabidopsis thaliana*. Communicative & Integrative Biology **11**.

Ruuska SA, Lewis DC, Kennedy G, Furbank RT, Jenkins CLD, Tabe LM. 2008. Large scale transcriptome analysis of the effects of nitrogen nutrition on accumulation of stem carbohydrate reserves in reproductive stage wheat. Plant Molecular Biology **66**, 15–32.

S

Safavi-Rizi V, Franzaring J, Fangmeier A, Kunze R. 2018. Divergent N Deficiency-Dependent Senescence and Transcriptome Response in Developmentally Old and Young Brassica napus Leaves. Frontiers in Plant Science **9**.

Satoh H, Uchida A, Nakayama K, Okada M. 2001. Water-soluble chlorophyll protein in Brassicaceae plants is a stress-induced chlorophyll-binding protein. Plant and Cell Physiology **42**, 906–911.

Schaller A. 2004. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. Planta **220**, 183–197.

Schiltz S, Gallardo K, Huart M, Negroni L, Sommerer N, Burstin J. 2004. Proteome reference maps of vegetative tissues in pea. An investigation of nitrogen mobilization from leaves during seed filling. Plant Physiology **135**, 2241–2260.

Schjoerring JK, Bock JGH, Gammelvind L, Jensen CR, Mogensen VO. 1995. Nitrogen incorporation and remobilization in different shoot components of field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*). Plant and Soil **177**, 255–264.

Schmidt K, Fufezan C, Krieger-Liszkay A, Satoh H, Paulsen H. 2003. Recombinant water-soluble chlorophyll protein from *Brassica oleracea Var. Botrys* binds various chlorophyll derivatives. Biochemistry **42**, 7427–7433.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nature Methods **9**, 671–675.

Schuhmann H, Adamska I. 2012. Deg proteases and their role in protein quality control and processing in different subcellular compartments of the plant cell. Physiologia Plantarum **145**, 224–234.

Schulte auf'm Erley G, Behrens T, Ulas A, Wiesler F, Horst WJ. 2011. Agronomic traits contributing to nitrogen efficiency of winter oilseed rape cultivars. Field Crops Research **124**, 114–123.

Seltmann MA, Stingl NE, Lautenschlaeger JK, Krischke M, Mueller MJ, Berger S. 2010. Differential impact of lipoxygenase 2 and jasmonates on natural and stress-induced senescence in Arabidopsis. Plant Physiology **152**, 1940–1950.

Singh U. 2006. Integrated nitrogen fertilization for intensive and sustainable agriculture. Journal of Crop Improvement **15**, 259–288.

Singh S, Giri MK, Singh PK, Siddiqui A, Nandi AK. 2013. Down-regulation of OsSAG12-1 results in enhanced senescence and pathogen-induced cell death in transgenic rice plants. Journal of Biosciences **38**, 583–592.

Singh S, Singh A, Nandi AK. 2016. The rice OsSAG12-2 gene codes for a functional protease that negatively regulates stress-induced cell death. Journal of Biosciences **41**, 445–453.

Smalle J, Vierstra RD. 2004. The ubiquitin 26s proteasome proteolytic pathway. Annual Review of Plant Biology **55**, 555–590.

Sorin C, Musse M, Mariette F, Bouchereau A, Leport L. 2015. Assessment of nutrient remobilization through structural changes of palisade and spongy parenchyma in oilseed rape leaves during senescence. Planta **241**, 333–346.

Spitzer C, Li F, Buono R, Roschzttardtz H, Chung T, Zhang M, Osteryoung KW, Vierstra RD, Otegui MS. 2015. The endosomal protein CHARGED MULTIVESICULAR BODY PROTEIN1 regulates the autophagic turnover of plastids in Arabidopsis. The Plant Cell **27**, 391–402.

Stessman D, Miller A, Spalding M, Rodermel S. 2002. Regulation of photosynthesis during Arabidopsis leaf development in continuous light. Photosynthesis Research **72**, 27–37.

Subash-Babu P, Alshatwi AA. 2018. Effects of increasing ratios of dietary omega-6/omega-3 fatty acids on human monocyte immunomodulation linked with atherosclerosis. Journal of Functional Foods **41**, 258–267.

Sullivan JA, Shirasu K, Deng XW. 2003. The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. Nature Reviews. Genetics **4**, 948–958.

Sun X, Fu T, Chen N, Guo J, Ma J, Zou M, Lu C, Zhang L. 2010*a*. The stromal chloroplast Deg7 protease participates in the repair of photosystem II after photoinhibition in Arabidopsis. Plant Physiology **152**, 1263–1273.

Sun X, Ouyang M, Guo J, Ma J, Lu C, Adam Z, Zhang L. 2010*b*. The thylakoid protease Deg1 is involved in photosystem-II assembly in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal **62**, 240–249.

Svečnjak Z, Rengel Z. 2006. Canola cultivars differ in nitrogen utilization efficiency at vegetative stage. Field Crops Research **97**, 221–226.

T

Tai Y-T. 2011. *Knockout and knockdown of two potential senescence gene in Arabidopsis*.

Takamiya A. 1973. Distribution of photoconvertible, water-soluble chlorophyll protein complex CP668 in plants related to *Chenopodium album*. Annual report of the Director Department of Plant Biology **72**, 330–336.

Tegeder M, Masclaux-Daubresse C. 2017. Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. New Phytologist **217**, 35–53.

Tegeder M, Rentsch D. 2010. Uptake and Partitioning of Amino Acids and Peptides. Molecular Plant **3**, 997–1011.

Thomas H, Smart CM. 1993. Crops that stay green. Annals of Applied Biology **123**, 193–219.

Thomas H, Stoddart JL. 1980. Leaf senescence. Annual Review of Plant Physiology **31**, 83–111.

Thomsen HC, Eriksson D, Møller IS, Schjoerring JK. 2014. Cytosolic glutamine synthetase: a target for improvement of crop nitrogen use efficiency? Trends in Plant Science **19**, 656–663.

Tilsner J, Kassner N, Struck C, Lohaus G. 2005. Amino acid contents and transport in oilseed rape (*Brassica napus* L.) under different nitrogen conditions. Planta **221**, 328–338.

Tittonel ED, Chaput JP, Letoublon F, Bonnot O. 1988. Besoins en éléments minéraux du colza cultivé en France. Physiologie et élaboration du rendement Colza.68–72.

Triboi-Blondel A-M, Messaoud J, Rousseau P. 1988. Mise en place et fonctionnement des feuilles de colza d'hiver : relations azote-carbone et sénescence. Agronomie **8**, 779–786.

Tripathi MK, Mishra AS. 2007. Glucosinolates in animal nutrition: A review. Animal Feed Science and Technology **132**, 1–27.

Tsiatsiani L, Van Breusegem F, Gallois P, Zavialov A, Lam E, Bozhkov PV. 2011. Metacaspases. Cell Death and Differentiation **18**, 1279–1288.

U

U N. 1935. Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of B. napus and peculiar mode of fertilization. Japanese Journal of Botany **7**, 389–452.

Uddling J, Gelang-Alfredsson J, Piikki K, Pleijel H. 2007. Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. Photosynthesis Research **91**, 37–46.

Ulas A, Behrens T, Wiesler F, Horst WJ, Erley GS auf'm. 2013. Does genotypic variation in nitrogen remobilisation efficiency contribute to nitrogen efficiency of winter oilseed-rape cultivars (*Brassica napus* L.)? Plant and Soil **371**, 463–471.

V

Vieira M, Pissarra J, Veríssimo P, Castanheira P, Costa Y, Pires E, Faro C. 2001. Molecular cloning and characterization of cDNA encoding cardosin B, an aspartic proteinase accumulating extracellularly in the transmitting tissue of *Cynara cardunculus* L. Plant Molecular Biology **45**, 529–539.

W

Waditee-Sirisattha R, Shibato J, Rakwal R, Sirisattha S, Hattori A, Nakano T, Takabe T, Tsujimoto M. 2011. The Arabidopsis aminopeptidase LAP2 regulates plant growth, leaf longevity and stress response. The New Phytologist **191**, 958–969.

Wagner R, Aigner H, Funk C. 2012. FtsH proteases located in the plant chloroplast. Physiologia Plantarum **145**, 203–214.

Wang S, Blumwald E. 2014. Stress-induced chloroplast degradation in Arabidopsis is regulated via a process independent of autophagy and senescence-associated vacuoles. The Plant Cell **26**, 4875–4888.

Watanabe N, Lam E. 2011. Arabidopsis metacaspase 2d is a positive mediator of cell death induced during biotic and abiotic stresses. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology **66**, 969–982.

Weaver LM, Gan S, Quirino B, Amasino RM. 1998. A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. Plant Molecular Biology **37**, 455–469.

Wei B, Zhang W, Chao J, Zhang T, Zhao T, Noctor G, Liu Y, Han Y. 2017. Functional analysis of the role of hydrogen sulfide in the regulation of dark-induced leaf senescence in Arabidopsis. Scientific Reports **7**.

Wiesler F, Behrens T, Horst WJ. 2001. Nitrogen efficiency of contrasting rape ideotypes. Developments in Plant and Soil Sciences. Plant Nutrition. Springer, Dordrecht, 60–61.

Wingler A, Purdy S, MacLean JA, Pourtau N. 2006. The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. Journal of Experimental Botany **57**, 391–399.

Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ. 2007. An "Electronic Fluorescent Pictograph" Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. PLOS ONE **2**, e718.

Wojciechowska N, Sobieszczuk-Nowicka E, Bagniewska-Zadworna A. 2017. Plant organ senescence - regulation by manifold pathways. Plant Biology.

X

Xu Y, Huang B. 2009. Effects of foliar-applied ethylene inhibitor and synthetic cytokinin on creeping bentgrass to enhance heat tolerance. Crop Science **49**, 1876–1884.

Y

Yakushiji E, Uchino K, Sugimura Y, Shiratori I, Takamiya F. 1963. Isolation of water-soluble chlorophyll protein from the leaves of *Chenopodium album*. Biochimica et Biophysica Acta **75**, 293–298.

Yamada K, Matsushima R, Nishimura M, Hara-Nishimura I. 2001. A slow maturation of a cysteine protease with a granulin domain in the vacuoles of senescing Arabidopsis leaves. Plant Physiology **127**, 1626–1634.

Yang L, Mickelson S, See D, Blake TK, Fischer AM. 2004. Genetic analysis of the function of major leaf proteases in barley (*Hordeum vulgare* L.) nitrogen remobilization. Journal of Experimental Botany **55**, 2607–2616.

Z

Zavaleta-Mancera HA, Thomas BJ, Thomas H, Scott IM. 1999. Regreening of senescent Nicotiana leaves: II. Redifferentiation of plastids. Journal of Experimental Botany **50**, 1683–1689.

Żelisko A, García-Lorenzo M, Jackowski G, Jansson S, Funk C. 2005. AtFtsH6 is involved in the degradation of the light-harvesting complex II during high-light acclimation and senescence. Proceedings of the National Academy of Sciences **102**, 13699–13704.

Zhang D, Kato Y, Zhang L, Fujimoto M, Tsutsumi N, Sodmergen, Sakamoto W. 2010*a*. The FtsH protease heterocomplex in Arabidopsis: dispensability of Type-B protease activity for proper chloroplast development. The Plant Cell **22**, 3710–3725.

Zhang X, Liu S, Takano T. 2008. Two cysteine proteinase inhibitors from *Arabidopsis thaliana*, AtCYSa and AtCYSb, increasing the salt, drought, oxidation and cold tolerance. Plant Molecular Biology **68**, 131–143.

Zhang Y, Liu Z, Wang X, Wang J, Fan K, Li Z, Lin W. 2018. DELLA proteins negatively regulate dark-induced senescence and chlorophyll degradation in Arabidopsis through interaction with the transcription factor WRKY6. Plant Cell Reports, 1–12.

Zhang M-P, Zhang C-J, Yu G-H, Jiang Y-Z, Strasser RJ, Yuan Z-Y, Yang X-S, Chen G-X. 2010*b*. Changes in chloroplast ultrastructure, fatty acid components of thylakoid membrane and chlorophyll a fluorescence transient in flag leaves of a super-high-yield hybrid rice and its parents during the reproductive stage. Journal of Plant Physiology **167**, 277–285.

Zhang H, Zhou C. 2013. Signal transduction in leaf senescence. Plant Molecular Biology **82**, 539–545.

Zienkiewicz M, Ferenc A, Wasilewska W, Romanowska E. 2012. High light stimulates Deg1-dependent cleavage of the minor LHCII antenna proteins CP26 and CP29 and the PsbS protein in *Arabidopsis thaliana*. Planta **235**, 279–288.

Zimmermann P, Zentgraf U. 2005. The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. Cellular & Molecular Biology Letters **10**, 515–534.

JAMES Maxence, 2018
Thèse de l'Université de Caen Normandie au sein de l'École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (Spécialité : Sciences agronomiques, Biotechnologies agro-alimentaires).
UMR INRA-UCN 950 EVA (Écophysiologie Végétale Agronomie et nutritions N, C, S).

Titre : Etude de systèmes protéolytiques et anti-protéolytiques impliqués dans la remobilisation de l'azote au cours de la sénescence chez les Brassicacées (*Arabidopsis thaliana* L., *Brassica napus* L).

Résumé : Le colza (*Brassica napus* L.) est une plante de grande culture particulièrement exigeante en azote (N) et caractérisée par une faible Efficience d'Usage de l'Azote (EUA), principalement due à une mauvaise Efficience de Remobilisation de l'Azote (ERA) au cours de la sénescence foliaire. L'optimisation de l'ERA est donc un enjeu majeur pour améliorer le bilan agro-environnemental de cette culture. La dégradation des protéines étant l'un des processus clés de la remobilisation de l'N associée à la sénescence, l'objectif de ce travail est d'identifier et caractériser les principaux acteurs de la protéolyse lors de la sénescence naturelle ou induite par une limitation en N. Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* cultivée en condition de forte disponibilité en N (HN), nous avons montré que SAG12 est une protéase majeure lors de la sénescence foliaire afin d'assurer la remobilisation de l'N essentielle à l'élaboration du rendement et au remplissage en N des graines. En effet, nos travaux montrent que le rôle de SAG12 est central et qu'en absence de son activité, d'autres protéases appartenant au CPs, mais aussi à d'autres classes (protéases à aspartate ; APs), sont sollicitées pour soutenir la remobilisation de l'N foliaire. Dans ce contexte, AED1 (une APs CND41-like) est particulièrement intéressante puisqu'elle semble collaborer étroitement avec SAG12. Par ailleurs, cette étude met en évidence pour la première fois une localisation racinaire de SAG12. Dans cet organe, le rôle de SAG12 est crucial pour remobiliser l'N des racines pour maintenir le rendement et la teneur en N des graines lorsque les plantes sont soumises à une limitation en N. Un autre volet de ce travail a consisté à étudier d'autres moyens de réguler l'activité protéolytique en se focalisant notamment sur des systèmes anti-protéolytiques. Cette étude suggère qu'une Water Soluble Chlorophyll binding Protein (WSCP), la protéine WSCP1, porte effectivement une double fonction de protection des chlorophylles et d'inhibiteur de protéases à sérine, ce qui en fait un potentiel candidat pour prolonger la durée de vie des feuilles et ainsi réduire l'asynchronisme entre la période de vidage des feuilles et la période de remplissage en N des graines.
L'ensemble de ces travaux permet de proposer de nouveaux candidats pertinents pour la sélection de variétés de colza présentant une remobilisation efficiente de l'N dans un contexte de limitation des intrants azotés.

Mots clés : azote, colza, feuilles, protéases, racines, remobilisation, rendement, SAG12, sénescence, WSCP

Title: Study of proteolytic and anti-proteolytic systems involved in nitrogen remobilization during senescence in Brassicaceae (*Arabidopsis thaliana* L., *Brassica napus* L).

Abstract: Rapeseed (*Brassica napus* L.) is a field crop plant that is particularly requiring nitrogen (N) and characterized by a low Nitrogen Use Efficiency (NUE), mainly due to a poor Nitrogen Remobilization Efficiency (NRE) during foliar senescence. The optimization of NRE is therefore a major challenge to improve the agro-environmental balance of this crop. Since protein degradation is one of the key processes in the remobilization of N associated with senescence, the objective of this work is to identify and characterize the main actors of proteolysis during natural or induced by N limitation senescence. In the plant model *Arabidopsis thaliana* grown under high N conditions (HN), we have shown that SAG12 is a major protease during leaf senescence to ensure the remobilization of N essential for yield and seed N filling. Indeed, our work shows that the role of SAG12 is pivotal and that in the absence of its activity, other proteases belonging to the CPs but also to other classes (aspartate proteases; APs) are requested to support the remobilization of foliar N. In this context, AED1 (a CND41-like APs) is particularly interesting since it seems to collaborate closely with SAG12. In addition, this study shows for the first time a root localization of SAG12. In this organ, the role of SAG12 is crucial, in particular to remobilize N from the roots to sustain yield and N content of the seeds when plants face an N limitation. Another aspect of this work was to study other ways of regulating proteolytic activity, focusing in particular on anti-proteolytic systems. This study suggests that a Water Soluble Chlorophyll binding Protein (WSCP), the WSCP1 protein, has effectively a dual function of chlorophyll protection and serine proteases inhibition, which make it a potential candidate to extend leaf lifespan and thus, reduce asynchronism between leaf emptying time and the N seed filling time.
Altogether, these results allow to suggest new relevant candidates for the selection of rapeseed varieties with an efficient N remobilization in a context of nitrogen input limitation.

Keywords: leaves, nitrogen, proteases, rapeseed, remobilization, roots, SAG12, senescence, WSCP, yield