



UMR INRA-UCBN 950

Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N, C, S

Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée

Université de Caen Basse-Normandie

DIPLÔME D'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

**Mécanismes de défense et mobilisation de l'azote
chez les plantes**

Présenté à l'Université de Caen-Basse-Normandie

par

Philippe ETIENNE

le 15 Septembre 2009,

devant le jury composé de :

David Wendehenne, Professeur, Université de Bourgogne (Rapporteur)

Alain Bouchereau, Professeur, Université de Rennes I (Rapporteur)

Alain Ourry, Professeur, Université de Caen Basse-Normandie (Rapporteur)

Judith Burstin, Directrice de Recherches, INRA Dijon (Examinatrice)

Frédéric Le Dily, Professeur, Université de Caen Basse-Normandie (Examineur)

SOMMAIRE

I-Curriculum vitae	p.1
II-Encadrements	p.4
III-Activités d'enseignement	p.7
IV-Publications et collaborations scientifiques	p.10
V-Activités de recherche	p.14
- Avant-propos	p.15
- Recherche doctorale : mécanismes naturels de défense des plantes et protéasome	p.16
- Recherche Post-doctorale (ATER): β-oxydation et thiolases peroxysomiales	p.21
- Recherche Post-doctorale (MCU) : mobilisation de l'azote associée à la sénescence foliaire chez <i>Brassica napus</i> L.	p.23
VI-Perspectives de recherche	p.37
VII- Publications	p.44

Photos en couverture (bas en haut) :
Champ de colza (*Brassica napus* L.)
Souris commune (*Mus musculus*)
Champ de tabac (*Nicotiana tabaccum*)

I- *CURRICULUM VITAE*

ETIENNE Philippe,
19 Place Reine Mathilde
14000 CAEN
Tél : 02 31 93 08 23
Email : philippe.etienne@unicaen.fr

né le 13 juillet 1972 à Langres (52),
Vie maritale, un enfant.

Adresse professionnelle :

UMR INRA UCBN 950
Ecophysiologie Végétale & Agronomie, nutriments N, C, S (E.V.A.)
Université de Caen Basse-Normandie, 14000 F-Caen
Tél : 02 31 56 54 34

*Maître de Conférences en Physiologie Végétale (66^{ème} Section C.N.U.),
4^{ème} échelon de la Classe Normale,
Bénéficiaire de la Prime d'Encadrement Doctoral et de Recherche (2008-2012)*

I.1 PARCOURS PROFESSIONNEL

-Sept. 2003: Titularisation au poste de Maître de Conférences, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale & Agronomie, nutriments N, C, S (EVA).

Principaux thèmes de recherche:

- ✓ Mobilisation de l'azote associée à la sénescence foliaire du colza (*Brassica napus* L.)
- ✓ Amélioration de l'efficacité des intrants azotés chez le colza (*Brassica napus* L.)

-Sept. 2002: Maître de Conférences à l'UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale & Agronomie, nutriments N, C, S (EVA), Université de Caen Basse-Normandie.

-Oct. 2001-Sept 2002: ATER au Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (LBMC), Université de Bourgogne, Dijon (21).

I.2 DIPLÔMES

-Sept. 2001: Doctorat de l'Université de Bourgogne, Option Biologie Moléculaire et Cellulaire.
Mention : Très Honorable avec félicitations du jury.

Sujet de recherche: « Régulation de l'expression du gène *tcl7*, codant une sous-unité de protéasome, au cours de la mise en place des réactions de défense des plantes. » (Allocataire MNERT et Moniteur de l'Enseignement Supérieur », Dir. L. Suty

Jury: F. MARTY (Président), D. Roby, H.P. Schmid, E. Solary, J. Negrel, L.Suty

-Sept. 1998: Diplôme d'Etudes Approfondies de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Bourgogne.

Mention: Bien.

Sujet de recherche: « Spécificité d'induction et recherche du promoteur de *tcl7*, un gène codant une sous-unité β de protéasome, activé chez le tabac par des éliciteurs de réactions de défense ».

I.3 PARTICIPATIONS A DES ACTIVITES CONTRACTUELLES

-2008-2011: Co-Responsable (50%, Ph. Lainé 50%) du projet AZOSTIMER (labellisé par le Pôle de Compétitivité Mer-Bretagne) en collaboration avec le groupe industriel TIMAC (Saint-Malo), l'Ecole de Chimie de Rennes et la société FORCE-A (Orsay).. Deux thèses sont affectées au projet. Une de ces thèses (Laetitia Jeannin) est placée sous mon co-encadrement à 50% (Pr. A. Ourry, 50%). Ce projet doctoral a pour objectif d'identifier et développer de nouveaux engrais d'origine biologique (extraits d'algues

et/ou d'acides humiques) utilisables en substitution ou en complément des engrais chimiques pour la culture des plantes d'intérêt agronomique.

- 2007-2010: ANR GENOPLANTE GERNEGY (20%)** (N°ANRGPLA07): Improvement of the yield of the rapeseed crop in the context of biofuel production.
- 2006-2008: ANR ARCOLE, GENOPLANTE 2010 (10%)** (N° ANR_05 GNPA_032): Efficacité de la nutrition azotée du colza: identification de cibles de sélection.
- 2005-2008: ANR Jeunes chercheurs COSMOS (40%)** (N°JC05_51096) : colza/soufre : Cycle du soufre et mobilisation des composés soufrés et azotés en réponse à une oligotrophisation en soufre.
- 2004-2006: ANR GENOPLANTE Projet B4 (5%)** (N° GNP_B04) : Amélioration de l'utilisation de l'azote : de la plante modèle aux plantes cultivées.

I.4 EXPERTISES SCIENTIFIQUES

- **Activités de Referee** pour *Trends in Plant Science, Botanique et Journal of Experimental Botany*.
- **Activités d'expertise:** projets AGROBI (Projets de recherche soumis pour obtention d'un financement INRA); Projet Hors Contrat de Plan (Contrat d'Etude Recherche et Innovation soumis pour obtention d'un financement Conseil Général de Côte d'Or).

I.5 RESPONSABILITES COLLECTIVES

- Depuis 2009: Membre du Comité de Sélection** de l'université de Caen Basse-Normandie, section 66. Participation à la campagne de recrutement 2009-2010 des ATER.
- 2003-2007: Membre élu de la Commission de spécialistes mixte** 66, 67, 68 et 69^{ème} Sections de l'Université de Caen Basse-Normandie.

➤ *Au niveau de la recherche :*

- **Depuis 2004: Personne ressource en Biologie Moléculaire au sein de l'UMR** : participation à l'acquisition de nouveaux outils d'analyses comme par exemple, la PCR quantitative en temps réel largement utilisée par l'ensemble des chercheurs de l'UMR. A ce titre, je participe également à la formation des personnels permanents et stagiaires qui désirent utiliser les techniques de biologie moléculaire.
- Depuis 2003: Responsable Qualité** de l'UMR 950 dans le cadre de la Mission de Qualité de l'INRA.

➤ *Au niveau de l'enseignement :*

- **Depuis 2004:** Participation aux jurys de soutenances des rapports de Master 2 Pro ECO-CAEN.
- **Depuis 2003: Responsable** des travaux pratiques de Physiologie Végétale de L 2 (BI301).
- **De 2002 à 2007: Responsable** du module d'Initiation aux métiers de l'enseignement L3 (BI615).

II-ENCADREMENTS

II.1 ENCADREMENT DOCTORAL

Les taux de participation ainsi que les noms des co-encadrants sont indiqués entre parenthèses

-**2008-2011: Jannin Laetitia:** Allocataire sur contrat AZOSTIMER, Pôle de compétitivité Mer-Bretagne, avec financement du Fond Unique Interministériel (Etienne Ph., 50%; Pr. Ourry A., 50%).

Sujet de thèse : *Impact d'un apport d'extraits algaux ou d'acides humiques sur la nutrition azotée du colza (Brassica napus L.).*

-**2006-2009: Dubousset Lucie** (née Le Gou) : Allocataire MESR et moniteur de l'Enseignement Supérieur (Etienne Ph., 50%; Pr. Avice J.C., 50%).

Sujet de thèse : *Effets d'une oligotrophisation croisée S et N sur l'efficacité d'utilisation de N et S au niveau foliaire chez le colza. Soutenance prévue fin 2009.*

Publications en lien avec la thèse : [A.2].

- **2005-2008: Desclos Marie:** Allocataire INRA-Région Bas Normandie (Etienne Ph., 50%; Pr. Avice J.C. 50%).

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

Soutenue le 10 décembre 2008 (36 mois) à l'Université de Caen Basse-Normandie, mention très honorable avec félicitations écrites du jury. **Situation actuelle:** **Post-doctorat** UMR INRA-UCBN 950 EVA dans le cadre du contrat ANR-MEEDAT «VITAL¹» (sous la direction de Ph. Laîné).

Publications en lien avec la thèse : [A.1], [A.3], [A.5], [C.2], [S.1].

- **2003-2006: Gombert Julie** : Allocataire CETIOM (Pr. Le Dily F., 45%; Pr. Ourry A., 45%; Etienne Ph., 10%).

Sujet de thèse : *Efficacité d'utilisation de l'azote par le colza d'hiver (Brassica napus L.) : effet de la fertilisation azotée et de la variabilité génotypique.*

Soutenue le 11 Décembre 2006 (36 mois) à l'Université de Caen Basse-Normandie, mention très honorable. **Situation actuelle:** **Post-doctorat UMR INRA-UEVE 1165 URGV, Evry.**

Publications en lien avec la thèse : [A.2], [A.6], [C.O.1], [C.1], [R.1].

II.2 ENCADREMENT DE MASTERS 2 RECHERCHE

Les taux de participation ainsi que les noms des co-encadrants sont indiqués entre parenthèses.

- **2006-2007: Desfeux Anne-Sophie:** Master 2 Recherche Biologie Fondamentale et Appliquée spécialité Biologie Cellulaire, Option Ecophysiologie Végétale. Université de Caen Basse-Normandie, Mention Bien. (Etienne Ph., 50%; Pr. Avice J.C. 50%).

Sujet de recherche : *Effets d'une carence en sulfate couplée à une carence en nitrate sur la sénescence et la mobilisation des composés N & S chez Brassica napus L.*

- **2005-2006: Le Gou Lucie:** Master 2 Recherche Biologie Fondamentale et Appliquée spécialité Biologie Cellulaire, Option Ecophysiologie Végétale. Université de Caen Basse-Normandie, Mention Très Bien. (Etienne Ph., 50%; Pr. Avice J.C. 50%).

Sujet de recherche : *Mobilisation de l'Azote au cours de la sénescence foliaire chez le colza (Brassica napus L.) : modifications du protéome et intervention d'inhibiteurs de protéases.*

¹ ANR-MEEDAT «VITAL»: ecosystem service provision from coupled plant and microbial function diversity unmanaged grasslands.

- **2003-2004: Simon Laure** : Master 2 Recherche Biologie Fondamentale et Appliquée spécialité Biologie Cellulaire, Option Ecophysiologie Végétale. Université de Caen Basse-Normandie, Mention Assez Bien. (Etienne Ph., 100%).
Sujet de recherche : *Contribution à l'étude de la sénescence foliaire chez le colza (Brassica napus L.) : impact sur les protéines solubles foliaires.*
- 2002-2003: Gombert Julie** : D.E.A. Adaptation des plantes aux contraintes environnementales, Université de Paris XI, Mention Bien. (Etienne Ph., 50%; Pr. Le Dily F., 50%).
Sujet de recherche : *Caractérisation de la sénescence foliaire chez le colza (Brassica napus L.) et expression de marqueurs moléculaires.*
- 1998-1999: Dahan Joseph** D.E.A. de Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Bourgogne. Mention Assez Bien. (Etienne Ph., 50%; Suty L., 50%).
Sujet de recherche : *Régulation de l'expression par la cryptogéine, de gènes codant différentes sous-unités de protéasome 20S de tabac.*

II.3 AUTRES ENCADREMENTS

- 2009: Levallois Julie**: 2^{ème} année de B.T.S. Analyses de données, Lycée Jean Rostand (Caen). Co-encadrement à 50% avec Laîné Ph. (MCU). **Sujet**: *Etude de la régulation de l'absorption du nitrate et du sulfate chez le colza (Brassica napus L.) par un tripeptide : le glutathion.*
- 2006: Desfeux Anne-Sophie** : Master 1 de Biologie Fondamentale et Appliquée, Université de Caen Basse-Normandie. **Sujet**: *Etude de la composition en protéines de graines de colza (Brassica napus L.) : effets de la fertilisation azotée et du génotype.*
- 2005: Le Gou Lucie** : Master 1 de Biologie Fondamentale et Appliquée, Université de Caen Basse-Normandie. **Sujet**: *Effet du glucose sur la sénescence foliaire de plants de colza carencés en azote.*
- 2003: Le Nevenec Aude** : Maîtrise de Biochimie, Université de Bourgogne. **Sujet**: *Expression différentielle de 2 gènes de thiolases peroxysomiales dans différents tissus murins. Effet du fénofibrate et de la rosiglitazone sur l'expression de ces deux gènes.*

III-ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT

III.1 ALLOCATAIRE-MONITORAT; UNIVERSITE DE BOURGOGNE (1998-2001, 64h eq. TD/an)

Affecté au Département de Biologie Animale de l'Université de Bourgogne, il m'a été confié l'enseignement du module « **Concours B Agro-Alimentaires** » (CBAA) pour un volume horaire de **48 h eq. TD**. J'ai effectué les **16 h eq. TD** restantes en Travaux Pratiques de **Biologie Cellulaire** (1^{ère} de DEUG B).

✓ **Module CBAA (48 h eq. TD)**

Ce module avait pour objectif principal de préparer les étudiants de 2^{ème} année de DEUG B aux concours d'entrée dans les écoles d'ingénieurs agroalimentaires. L'enseignement était dispensé sous forme de travaux dirigés au cours desquels différents types d'exercices étaient abordés:

- Approfondissements des cours de biologie enseignés en deuxième année de DEUG B,
- Entraînements aux exposés oraux et simulations d'entretiens devant un jury,
- Analyses d'articles scientifiques (en anglais),
- Exposés en groupe sur un sujet d'actualité (en rapport avec la biologie).

Effectif: 1 groupe de 27 étudiants/an.

✓ **Travaux Pratiques de Biologie Cellulaire (16 h eq. TD)**

Durant ces séances de Travaux Pratiques de Biologie Cellulaire (1^{ère} année de DEUG B), les thèmes suivants ont été abordés:

- Introduction à l'étude de la cellule et initiation à la microscopie photonique,
- La cellule procaryote : comparaison avec la cellule eucaryote,
- Membrane plasmique et perméabilité cellulaire (phénomène d'osmose et diffusion),
- Mitochondries et chloroplastes,
- Cellules spécialisées et différenciation cellulaire.

Effectif: 2 groupes d'environ 20 étudiants.

III.2 ATER; UNIVERSITE DE BOURGOGNE (2001-2002, ½ poste soit 88 h eq. TD)

Recruté sur un demi-poste d'Attaché Temporaire de l'Enseignement et de la Recherche (ATER) à compter du 01 Octobre 2001 pour une durée de 11 mois, j'ai été affecté au Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (LBMC) de l'Université de Bourgogne sous la direction du Pr. N. Latruffe. Mes **88 h eq. TD** d'enseignement étaient réparties comme suit:

✓ **48 h eq. TD** de module **CBAA** (Voir § III.1.)

✓ **40 h eq. TD** de **Travaux Pratiques de Biochimie** en licences de Biochimie et de Biologie.

Les TP de Biochimie ont été réalisés dans les modules de Biochimie Structurale et Métabolique (BSM : TP de Licence de Biologie) et de Biochimie Métabolique et Cellulaire (BMC: Licence de Biochimie). Durant ces TP, les thèmes suivants ont été abordés:

- Dosage de la trypsine et chromatographie gaz-liquide,
- Dosage des fonctions thiols de l'ovalbumine,
- Comparaison de plusieurs méthodes de dosages des protéines (Microbiuret, Lowry, Bradford),
- Electrophorèses et dosages des protéines sériques.

Effectif: 2 groupes (1 Licence de Biologie et 1 Licence de Biochimie : environ 20 étudiants/groupe).

III.3 MAITRE DE CONFERENCES; UNIVERSITE DE CAEN (depuis Sept. 2002, 192 h eq. TD)

En qualité de Maître de Conférences à l'Université de Caen Basse-Normandie, j'assure annuellement, à l'Institut de Biologie Fondamentale Appliquée (IBFA), un service d'enseignement complet (soit **192 h eq. TD**) réparti en:

- ✓ **Travaux Pratiques et Dirigés de Biologie Cellulaire** (Licence 1, Module BI 101: **TD: 18 h eq. TD; TP : 26 eq. TD**) durant lesquels les thèmes suivants ont été abordés :
 - Méthodes d'études de la cellule,
 - Les cellules procaryotes et eucaryotes,
 - Mécanismes génétiques fondamentaux,
 - Surface cellulaire et relations intercellulaires
 - Systèmes endomembranaires.

Effectif: 1 groupe TD (30 étudiants) et 2 groupes TP (15 étudiants/groupe).

- ✓ **Travaux Pratiques et dirigés de Physiologie Végétale** (Licence 2, Module BI 301: **TD : 20h eq.TD; TP: 80 h eq. TD**) durant lesquels les thèmes suivants sont abordés:
 - Photosynthèse et respiration des végétaux,
 - Métabolisme azoté,
 - Les phytohormones.

Effectif: 2 groupes TD (25 étudiants/groupe) et 6 groupes TP (15 étudiants/groupe).

- ✓ **Travaux Dirigés de Physiologie Végétale** (Master 1, Modules BI841 (**10 h eq. TD**) et BI743 (**6 h eq. TD**). Ces TD traitent essentiellement de l'adaptation des plantes vis-à-vis de leur environnement (relations plante-agents pathogènes, acclimatation des plantes au froid, sénescence et contrainte nutritionnelle).

Effectifs: 1 groupe TD BI841 (30 étudiants) et 2 groupes TD BI743 (15 étudiants/groupe).

- ✓ **Projet Personnel Etudiant** (Licence 1: **10 h eq. TD**).

Effectif: 1 groupe de 5 étudiants

- ✓ **Projets tutorés Master 2 Pro Eco-Caen: 10 h eq. TD.**
- ✓ **Cours magistraux : 12 h eq. TD:**
 - L'agriculture en France (Master 2 Pro Eco-Caen) : **3h** eq. TD,
 - Mécanismes de défense des plantes (Masters 2 Pro EcoCaen et AquaCaen) : **6 h** eq. TD,
 - Sénescence foliaire et mobilisation de l'azote (Master 2 Recherche) : **3h** eq. TD.

IV-PUBLICATIONS ET COLLABORATIONS SCIENTIFIQUES

IV.1 PUBLICATIONS (<i>le(s) nom(s) des étudiants encadrés sont souligné(s)</i>)

Publications de rang A (A.):

- A.1-Desclos M., Etienne P., Coquet L., Cosette P., Bonnefoy J., Ségura R., Rezé S., Ourry A., Avice J.C. (2009)** A combined ¹⁵N tracing/proteomics study in *Brassica napus* reveals the chronology of proteomics events associated with remobilization during leaf senescence by nitrate limitation or starvation. *Proteomics*, **IF: 5,48.**
- A.2-Dubousset L., Abdallah M., Desfeux A.S., Etienne P., Meuriot F., Hawkesford M.J., Gombert J., Ségura R., Bataillé M.P., Rezé S., Bonnefoy J., Ameline A.F. Ourry A., Le Dily F., Avice J.C. (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*, **IF 3,92.**
- A.3-Desclos M., Dubousset L., Etienne P., Le Cahérec F., Satoh H., Bonnefoy J., Ourry A., Avice J.C. (2008)** A proteomic profiling approach to reveal a novel *Brassica napus* drought 22 kD/water-soluble chlorophyll binding protein in young leaves during nitrogen remobilization induced by stressful conditions. *Plant Physiology*, 147: 1830-1843, **IF: 6,37.**
- A.4-Leblanc A., Renault H., Lecourt J., Etienne P., Deleu C., Le Deunff E. (2008)** Elongation changes of exploratory and root hair systems induced by ACC and AVG affect nitrate uptake and the *BnNrt2.1* and *BnNrt1.1* transporters genes expression in *Brassica napus*. *Plant Physiology*, 146: 1928-1940, **IF: 6,37.**
- A.5-Etienne P., Desclos M., Le Gou L., Gombert J., Bonnefoy J., Maurel K., Le Dily F., Ourry A., Avice J.C. (2007)** N-protein mobilization associated to leaf senescence process of oilseed rape (*Brassica napus* L.) is concomitant with the disappearance of a trypsin inhibitor activity. *Functional Plant Biology*, 34: 895-906, **IF: 2,38.**
- A.6-Gombert J., Etienne P., Le Dily F., Ourry A. (2006)** The expression patterns of *SAG12/Cab* genes reveal the spatial and temporal progression of leaf senescence in *Brassica napus* L. with sensitivity to environment. *Journal of Experimental Botany* 57: 1949-1956, **IF: 3,92.**
- A.7-Lequeu J., Simon-Plas F., Fromentin J., Etienne P., Petitot A.S., Blein J.P., Suty L. (2005)** Proteasome comprising a β -1 inducible subunit acts as a negative regulator of NADPH oxidase during elicitation of plant defense reactions. *FEBS Letters*, 579: 4879-4886, **IF: 3,26.**
- A.8-Chevillard G., Clémencet M.C., Etienne P., Martin P., Pineau T., Latruffe N., Nicolas-Frances V. (2004)** Molecular cloning, gene structure and expression profile of two mouse peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase genes. *BMC Biochemistry (e-pub)*, 25: 5-13, **IF: 2,34.**
- A.9-Suty L., Lequeu J., Lancon A., Etienne P., Petitot A.S., Blein J.P. (2003)** Preferential induction of 20S proteasome subunits during elicitation of plant defense reactions: towards the characterization of "plant defense proteasomes". *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35: 637-650, **IF: 4,01.**
- A.10-Chevillard G., Clémencet M.C., Etienne P., Martin P., Pineau T., Latruffe N., Nicolas-Frances, V. (2003)** Tissue-specific expression of two peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase genes in wild and PPAR alpha-null mice and induction by fenofibrate. *Advances in Experimental Medicine & Biology* 544: 55-56, **IF: 0,66.**
- A.11-Latruffe N., Nicolas-Frances V., Clémencet M.C., Hansmannel F., Chevillard G., Etienne P., Le Jossic-Corcus C., Malki M.C. (2003)** Gene regulation of peroxisomal enzymes by nutrients, hormones and nuclear signalling factors in animal and human species. *Advances in Experimental Medicine & Biology* 544: 225-236, **IF: 0,66.**
- A.12-Dahan J., Etienne P., Petitot A.S., Houot V., Blein J.P., Suty, L. (2001)** Cryptogein affects expression of alpha 3, alpha 6 and beta 1 20S proteasome subunits encoding genes in tobacco. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1947-1948, **IF: 3,92.**
- A.13-Houot V., Etienne P., Petitot A.S., Barbier S., Blein J.P., Suty L. (2001)** Hydrogen peroxide induces programmed cell death features in cultured tobacco BY-2 cells, in a dose-dependent manner. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1721-1730, **IF: 3,92.**

A.14-Etienne P., Petitot A.S., Houot V., Blein J.P., Suty L. (2000) Induction of *tcl 7*, a gene encoding a *beta*-subunit of proteasome, in tobacco plants treated with elicitors, salicylic acid or hydrogen peroxide. *FEBS Letters*, 466: 213-218, **IF: 3,26**

A.15-Rusterucci C., Montillet J.L., Agnel J.P., Battesti C., Alonso B., Knoll A., Bessoule J.J., **Etienne P.**, Suty L. Blein J.P., Triantaphylides C. (1999) Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogin on tobacco leaves. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 36446-36455, **IF: 5,59**.

Chapitre d'ouvrage (C.O.):

C.O.1-Gombert J., **Etienne P.**, Allirand J.M., Jullien A., Le Dily F., Ourry A., Ney B. (2009) L'azote dans la plante : dynamique de répartition entre les organes. A paraître dans « Le Colza et l'Azote », *CETIOM éditions*.

Actes de colloques (C.):

C.1-Gombert J., Le Dily F., **Etienne P.**, Laîné P., Ourry A. (2007) Nitrogen dynamics in field grown oilseed rape. Effect of nitrogen fertilisation and genotype. Proceeding of 12th International rapeseed congress, *Agronomy: Sol Nutrition*, 3: 231-234.

C.2-Desclos M., Le Gou L., **Etienne P.**, Simon L., Le Dily F., Ourry A., Avice J.C. (2007) Identification of a protease inhibitor (BnD22) in leaf senescence process of oilseed rape (*Brassica napus* L.). Proceeding of 12th International rapeseed congress, *Agronomy: Soil Nutrition*, 3: 235-238.

Publications en revision (R.):

R.1-Gombert J., Le Dily F., **Etienne P.**, Rossato L., Allirand J.M., Jullien A., Savin A., Ourry A. (2009) Effect of nitrogen fertilization on nitrogen dynamics in oilseed rape using ¹⁵N-labelling field experiment. En révision à *Journal of Plant Nutrition & Soil Science*, **IF: 1,08**.

Publications soumises (S.):

S.1-Desclos M., **Etienne P.**, Lecaherec F., Leport L., Bouchereau A., Rezé S., Bonnefoy J., Ourry A., Avice J.C. Chronology of physiological, biochemical and molecular events involved in the N remobilisation and N recycling associated with leaf senescence in *Brassica napus*: impact of nitrate starvation. Soumis à *Plant Cell & Environment*, **IF: 4,50**.

Communications scientifiques (P.:Poster; O.: Oral)

P.1-Abdallah M., Dubousset L., Meuriot F., **Etienne P.**, Avice J.C., Ourry A. (2009) Effect of S availability on S uptake and remobilization during the vegetative growth of *Brassica napus* L. Les réserves végétales et leur importance agronomique et sylvicole, Caen (France): 9-10 juin 2009.

P.2-Dubousset L., Nesi N., **Etienne P.**, Avice J.C. (2009) Is the remobilization of S and N reserves for seed filling of winter oilseed rape modulated by sulphate restrictions applied at different growth stages? Les réserves végétales et leur importance agronomique et sylvicole, Caen (France): 9-10 juin 2009.

P.3-Abdallah M., Dubousset L., **Etienne P.**, Avice J.C., Ourry A., Meuriot F. (2008) Does mineral S availability alter S and ³⁴S dynamics during vegetative growth of rapeseed? 7th *International Workshop on Sulfur Metabolism in Plants*, Warsaw (Poland): May 13-17.

P.4-Desclos M., Le Gou L., **Etienne P.**, Bonnefoy J., Le Caherec F., Coquet L., Satoh H., Ourry A., Avice J.C. (2008) Leaf proteome survey during N remobilization induced by N starvation or MeJA reveals the protease inhibitor function of BnD22 (*Brassica napus* Drought 22 kDa), a protein possessing properties of Water-Soluble Chlorophyll binding Protein (WSCP) (2008). 11^{ème} *Journée de l'École Doctorale Normande Chimie-Biologie*, Le Havre (France): 14 Mars.

P.5-Desclos M., Le Gou L., **Etienne P.**, Bonnefoy J., Le Caherec F., Coquet L., Satoh H., Ourry A., Avice J.C. (2008) Leaf proteome survey during N remobilization induced by N starvation or MeJA reveals the protease inhibitor function of BnD22 (*Brassica napus* Drought 22 kDa), a protein possessing properties of Water-Soluble Chlorophyll binding Protein (WSCP), 6^{ème} *Congrès Jeunes Chercheurs (SFBV)*, Tours (France): 2-4 Juillet.

- P.6-Desclos M., Le Gou L., Etienne P., Bonnefoy J., Simon L., Le Dily F., Ourry A., Avice J.C. (2007)** N-protein mobilization associated to leaf senescence process of oilseed rape (*Brassica napus* L.) is concomitant with the disappearance of trypsin inhibitor activity. *12th International Rapeseed Congress*, Wuhan (China): March 26-30.
- P.7-Gombert J., Le Dily F., Etienne P., Laine P., Ourry A. (2007)** Nitrogen dynamics in field grown oilseed rape. Effect of nitrogen fertilization and genotype. *12th International Rapeseed Congress*, Wuhan (China): March 26-30.
- P.8-Le Gou L., Desclos M., Bonnefoy J., Etienne P., Le Dily F., Ourry A., Avice J.C (2007)** Modification of proteome and involvement of protease inhibitors during leaf senescence in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *12th International Rapeseed Congress*, Wuhan (China): March 26-30.
- P.9-Desclos M., Le Gou L., Etienne P., Bonnefoy J., Simon L., Le Dily F., Ourry A., Avice J.C. (2006)** Proteome of leaf senescence in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *25^{ème} Congrès de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique*, St Malo (France): 6-8 Octobre.
- P.10-Gombert J., Etienne P., Le Dily F. (2005)** Metabolic changes and gene expression in senescing leaves of oilseed rape plants. *6^{ème} Colloque National de la Société Française Biologie Végétale*, Arcachon (France): 27-29 Avril.
- P.11-Etienne P., Petitot A.S., Dahan J., Houot V., Blein J.P. Suty L. (1999)** Induction of tcl7, a gene encoding a proteasome β -subunit in plants treated with elicitors hydrogen peroxide or salicylic acid. *Third Workshop on Proteasomes*, Clermont-Ferrand (France): March 24-27.
- O.1-Dubousset L., Abdallah M., Desfeux A-S., Etienne P., Meuriot F., Gombert J., Segura R., Bataille M-P., Rezé S., Bonnefoy J., Ameline A.F., Ourry A., Le Dily F., Avice J-C. (2008)** The remobilization of leaf N and S compounds in response to sulphate deficiency depends on nitrate availability in rapeseed. *7th International Workshop on Sulfur Metabolism in Plants*, Warsaw (Poland): May 13-17.
- O.2-Dubousset L., Abdallah M., Desfeux A-S., Etienne P., Meuriot F., Gombert J., Ourry A., Le Dily F., Avice J-C. (2008)** The remobilization of leaf N and S compounds in response to sulphate deficiency depends on nitrate availability in rapeseed. *11^{ème} Journée de l'École doctorale Normande Chimie-Biologie*, Le Havre (France): 14 Mars.

IV.2 COLLABORATIONS NATIONALES ET INTERNATIONALES

Les différentes collaborations ont été réalisées dans le cadre des activités indiquées entre parenthèses.

- **UMR INRA-AgroParisTech 1091, Environnement et Grandes Cultures**, Paris-Grignon. (Thèse J. Gombert, comité de pilotage M. Desclos, thèse L. Dubousset, réseau Colza-Azote : Rennes-Versailles-Grignon).
- **UR 511 Nutrition Azotée des Plantes**, INRA de Versailles. (Projet Génoplane B4 N° GNP_B04).
- **UMR INRA-AgroCampus 118 Amélioration des Plantes et Biotechnologies Végétales**, Rennes I. (Comité de pilotage M. Desclos, expérimentations communes sénescence-inhibiteurs de protéases, projets ANR (ENERGY, ARCOLE), réseau Colza-Azote).
- **Department of Biomolecular Science**, Université de Toho, Japon. (Inhibiteur de protéases BnD22).
- **UMR CNRS 6522 Polymères, Biopolymères, Membranes**, Rouen. (Plateau technique séquençage de protéines par spectrométrie de masse).
- **UMR CNRS 6510, Synthèse et Electrosynthèse Organiques**, Ecole Nationale de Chimie de Rennes. (Projet Azostimer).
- **Société TIMAC Agro-Fourniture**, Saint Malo. (Projet Azostimer).
- **Société Force-A**, Université Paris XI, Orsay. (Projet Azostimer)
- **Centre d'Investigation en Production Animale et Végétale (CIPAV)**, Université de Navarre, Espagne. (Projet Azostimer).
- **Société IMAXIO**, prestataire de services puces transcriptomiques, Clermont-Ferrand. (Projet Azostimer et autres projets nécessitant des analyses transcriptomiques de masse).

V-ACTIVITES DE RECHERCHE

Avant-propos

J'ai réalisé mes premiers travaux de recherche en 1997 sur les mécanismes de défense des plantes dans le cadre de mon stage de D.E.A. (D.E.A. de Biologie Moléculaire et Cellulaire de l'Université de Bourgogne) réalisé à l'UMR 692 Phytopharmacie et Biochimie des Interactions Cellulaires de l'INRA de Dijon. Ayant obtenu une bourse de thèse MNERT, j'ai pu poursuivre ces recherches au sein du même laboratoire pendant ma thèse (1998-2001). Durant ces quatre années, j'ai bénéficié d'un encadrement scientifique de qualité, qui m'a permis d'obtenir des résultats novateurs quant **au rôle du protéasome 26S dans la mise en place des mécanismes de défense des plantes en réponse à une attaque par un agent pathogène.**

A l'issue de cette thèse, mes compétences acquises en Biologie Cellulaire et Moléculaire m'ont permis d'obtenir un poste d'Agent Temporaire de l'Enseignement et de la Recherche (ATER) au Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de l'Université (LBMC) de Bourgogne. Ainsi, j'ai travaillé sur un des axes de recherche du LBMC dont l'objectif consiste à étudier **le contrôle du métabolisme lipidique par les proliférateurs de peroxysomes et les récepteurs nucléaires de type PPARs (Peroxisomes Proliferator-Activated Receptors) chez les mammifères.**

Enfin, en 2002, suite à mon recrutement en qualité de Maître de Conférences, j'ai intégré « l'équipe azote » de l'UMR INRA-UCBN 950, Ecophysiologie Végétale et Agronomie (EVA) de Caen, dont la thématique générale vise à étudier et à modéliser les flux d'azote (minéral et organique) chez une plante d'intérêt agronomique, le colza (*Brassica napus* L.). Dans ce contexte, j'ai rapidement développé un nouvel axe de recherche centré sur **l'étude des mécanismes physiologiques et moléculaires impliqués dans la mobilisation de l'azote endogène au cours de la sénescence foliaire du colza.**

Dans le cadre de ces différentes activités de recherche, j'ai également participé à l'encadrement de **4 doctorants et de 5 Masters** (ou DEA). Ces expériences, humainement et scientifiquement très enrichissantes, ont été pour moi une motivation supplémentaire pour candidater au diplôme d'Habilitation à Diriger des Recherches.

Mes activités de recherche développées au cours de ces 12 années m'ont permis d'aborder des thématiques extrêmement variées tant sur le plan des sujets d'étude que des approches utilisées. Ainsi, par souci de clarté, une présentation strictement chronologique des principaux résultats obtenus a été retenue et sera suivie des perspectives de recherche que j'envisage de développer au sein de l'UMR EVA.

[Quand ça change, ça change. Faut jamais se laisser démonter, M. Audiard, Les tontons flingueurs, 1963]

RECHERCHE DOCTORALE

Contexte scientifique: chez les végétaux, l'absence de cellules immunitaires spécialisées et d'anticorps capables de reconnaître spécifiquement un antigène, conduit à penser que ces organismes sont bien démunis face à une agression par un microorganisme. Cependant, la réalité est toute autre. En effet, les cires, les poils, la cuticule (qui recouvrent les organes végétaux) ou encore les parois cellulaires constituent de véritables barrières physiques permettant de limiter les infections par les agents pathogènes. Cependant, dans certains cas, l'agent pathogène contourne ces mécanismes « passifs » de défense et pénètre dans la plante via une blessure ou encore en dégradant les parois végétales grâce à des enzymes hydrolytiques. Dans ce cas, on distingue alors schématiquement deux types d'interactions possibles : l'interaction compatible et l'interaction incompatible qui correspondent respectivement à une non reconnaissance et une reconnaissance spécifique de l'agent pathogène par la plante. Alors que l'interaction de type compatible permet le développement de l'agent pathogène à l'origine de symptômes de maladie pouvant aller jusqu'à la mort du végétal, l'interaction incompatible est quant à elle basée sur la reconnaissance spécifique de l'agent pathogène par la plante via des molécules appelées éliciteurs (le plus souvent synthétisés par l'agent pathogène). Cette reconnaissance s'accompagne d'un véritable dialogue moléculaire à l'origine du déclenchement rapide et intense de réactions de défense de la plante qui se caractérisent, notamment, par l'apparition de nécroses hypersensibles localisées au niveau du site d'infection (Réaction Hypersensible, RH) et par l'acquisition d'un état de Résistance Systémique Acquise (RSA). La RSA dure alors plusieurs semaines et protège la plante d'une part, contre le microorganisme agresseur, et d'autre part, contre des agents pathogènes variés (figure 1). Au niveau cellulaire, cette reconnaissance spécifique s'accompagne de nombreuses modifications biochimiques et moléculaires comme par exemple l'induction de gènes codant des protéines de défense.

Dans la nature, si les interactions de type incompatible constituent la règle, les interactions de type compatible sont, quant à elles, à l'origine de lourdes pertes agricoles au niveau des plantes de grande culture. Actuellement, la lutte chimique reste le moyen le plus utilisé et le plus efficace pour protéger ces cultures contre d'éventuelles attaques d'agents pathogènes. Toutefois, dans un contexte de développement d'une agriculture raisonnée, plus respectueuse de l'environnement, l'utilisation de telles molécules, dont seulement 1 à 5% sont réellement utiles à la défense des plantes, fait largement débat. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes actifs de défense conduisant à la résistance des plantes vis-à-vis de leurs agresseurs constitue un axe de recherche intéressant pour le développement de nouvelles stratégies de phytoprotection visant à diminuer la pression des xénobiotiques sur l'environnement. C'est dans ce contexte, que j'ai réalisé mes travaux de D.E.A et de thèse à l'UMR 692 de Phytopharmacie et Biochimie des Interactions Cellulaires de l'INRA de Dijon.

V.1 Mécanismes de défense des plantes et protéasome.

(D.E.A. et thèse Ph. Etienne et D.E.A. de J. Dahan (1998-1999).

La recherche de gènes précocement induits lors des mécanismes de défense des plantes constituait un des axes de recherche développé au laboratoire de Phytopharmacie et Biochimie des Interactions Cellulaires. Ces travaux sont réalisés principalement à partir du modèle tabac-élicitines (éliciteurs² de réactions de défense synthétisés par les champignons oomycètes du genre *Phytophthora*), particulièrement bien adapté dans la mesure où le traitement de plants de tabac par des élicitines s'accompagne de l'apparition de nécroses hypersensibles visibles au niveau du site d'application (Réaction Hypersensible ou RH) et de la mise en place d'un état de Résistance Systémique Acquise (RSA).

² Eliciteur : substance intervenant dans une réaction hôte-agent pathogène et capable d'induire un état de résistance chez le végétal

Ainsi, les travaux réalisés au laboratoire par Petitot et *al.* (1997) ont montré qu'un gène codant une sous-unité $\beta 1$ (gène *tc17*) de protéasome³ était induit dans des suspensions cellulaires de tabac après 1h de traitement par la cryptogéine, **une éliciteine synthétisée par le champignon *Phytophthora cryptogea* var. *nicotianae*.**

Chez les animaux, le protéasome est impliqué dans la protéolyse ATP-dépendante de protéines étiquetées par l'ubiquitine. Au niveau cellulaire, il intervient dans (i) le contrôle qualité des protéines (turn-over, dégradation des protéines mutées ou endommagées suite à un stress) et (ii) la régulation de processus tels que le cycle cellulaire, la mort cellulaire programmée ou encore la réponse immunitaire (**figure 2**).

Cependant, chez les végétaux, le(s) rôle(s) du protéasome est (sont) encore mal connu(s). Ainsi, au début de mon travail de thèse, seuls quelques gènes codant des sous-unités de protéasome étaient clonés chez certaines espèces végétales (principalement chez *Oryza sativa* et *Glycine max.*).

Dans ce contexte, mon travail de thèse avait pour objectif principal d'étudier la régulation de l'expression du gène *tc17* au cours de la mise en place des mécanismes de défense des plantes afin de mieux appréhender le(s) rôle(s) potentiel(s) du protéasome dans ce processus.

V.1.1 Le gène et la protéine TCI7 sont-ils induits dans d'autres modèles d'étude ?

Un préalable à nos futurs travaux a consisté à vérifier que l'induction de ce gène n'était pas spécifique du modèle d'étude tabac-cryptogéine (ou *phytophthora cryptogea*). Par conséquent, l'expression du gène *tc17* a été suivie chez le tabac en réponse à un traitement par la parasiticéine (éliciteine synthétisée par l'agent pathogène *Phytophthora parasitica*) et par un autre agent pathogène, le Virus de la Mosaïque du Tabac (VMT). Les résultats présentés **figure 3** montrent que, quel que soit le traitement (cryptogéine, parasiticéine ou VMT), le gène *tc17* est induit dans les feuilles de tabac. De plus, l'induction de ce gène se produit toujours avant l'apparition de nécroses hypersensibles qui a lieu respectivement après 16 et 80 heures de traitement avec la parasiticéine et le VMT.

Conclusion : chez le tabac, l'induction du gène *tc17* est observée bien avant l'apparition de nécroses hypersensibles associée à la RH et ce, quel que soit le traitement éliciteur.

Nous avons ensuite voulu vérifier si l'induction de ce gène était ou non spécifique du tabac. Pour ce faire, nous disposons de deux variétés de colza connues pour répondre différemment à un traitement par la cryptogéine. Ainsi, la variété « Yudal » était qualifiée de réactive à la cryptogéine du fait de sa capacité à développer des nécroses hypersensibles en réponse au traitement par cet éliciteur, contrairement à la variété Bolko qualifiée de non réactive à la cryptogéine. Ainsi, après avoir réalisé le clonage de l'homologue du gène *tc17* chez le colza (alors appelé *cc17*, pour colza cryptogénine Induit), nous avons suivi l'expression de ce gène chez ces deux variétés de colza en réponse à la cryptogéine. Les résultats obtenus révèlent qu'en l'absence de traitement par la cryptogéine (0h), le gène *cc17* n'est pas (ou peu) exprimé chez les deux variétés de colza. Par contre, en réponse à un traitement à la cryptogéine, une forte induction du gène *cc17* est observée seulement chez la variété « Yudal » dite réactive à la cryptogéine. Cette induction intervient après 36 heures de traitement et précède, comme chez le tabac, l'apparition des nécroses hypersensibles qui a lieu après 96 heures.

Conclusion: l'accumulation de transcrits de *cc17* (homologue de *tc17* chez le colza) chez la variété de colza Yudal en réponse au traitement par la cryptogéine confirme que l'induction de ce gène (i) n'est pas spécifique du tabac et (ii) est corrélée à la mise en place des réactions de défense.

Enfin, la synthèse d'anticorps dirigés contre la protéine TCI7 nous a permis de montrer que l'induction du gène *tc17* est systématiquement suivie d'une accumulation de la protéine correspondante. Les cinétiques d'expression de la protéine établies pour chaque modèle d'étude, **montrent que la protéine est accumulée rapidement après l'induction du gène.** A titre d'exemple,

³ Protéasome: complexe protéolytique de plus de 700 kDa, constitué de 14 sous-unités α et 14 sous-unités β

après une heure de traitement à la cryptogéine, le gène et la protéine TCI7 sont induits dans les feuilles de tabac.

Ces travaux confirment que, lors de la mise en place des mécanismes de défense des plantes, l'induction du gène *tc17* (sous-unité $\beta 1$ de protéasome) est suivie d'une accumulation de la protéine correspondante.

Conclusion: à partir de différents modèles d'étude des mécanismes de défense des plantes, utilisant d'autres éliciteurs et/ou d'autres plantes (tabac-parasiticéine⁴, tabac-VMT, colza-cryptogéine), nous avons mis en évidence une corrélation entre l'accumulation des transcrits (et de la protéine) *tc17* et la mise en place des réactions de défense des plantes.

V.1.2 L'acide salicylique et le peroxyde d'hydrogène à l'origine de l'induction du gène *tc17*?

Afin de mieux comprendre les signaux moléculaires à l'origine de l'induction de *tc17*, le clonage du promoteur de ce gène a été réalisé en utilisant la technique de « marche sur le gène par PCR ». Ainsi, une séquence nucléotidique non codante en 5' de 1276 pb a été clonée et analysée en utilisant les banques d'éléments cis-régulateurs (Plantcare et PLACE disponible sur www.infobiogen.fr). Cette analyse nous a permis d'identifier de nombreux **éléments cis-régulateurs potentiels, et en particulier, des séquences capables de fixer des facteurs trans-régulateurs connus pour être induits par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'acide salicylique, deux molécules fortement accumulées lors de la mise en place des mécanismes de défense.**

Suite à l'identification de ces séquences cis-régulatrices potentielles au niveau du promoteur, l'expression du gène *tc17* a été suivie dans des suspensions cellulaires de tabac traitées avec de l'acide salicylique ou du peroxyde d'hydrogène. Ainsi, nous avons montré que **le gène *tc17* est induit en réponse au traitement par ces deux molécules (figures 4A et 4B)**. Par ailleurs, en réponse au traitement éliciteur (cryptogéine), une absence d'induction du gène *tc17* a été observée dans des tabacs transgéniques (NahG 8⁺)⁵ incapables d'accumuler l'acide salicylique (**figure 4C**) et dans des cellules de tabacs traitées avec des inhibiteurs de production d'H₂O₂ (Diphenyl Iodonium).

Conclusion: L'acide salicylique et le peroxyde d'hydrogène, deux molécules fortement accumulées lors de la mise en place des réactions de défense des plantes, sont capables d'induire le gène *tc17*. Ces résultats suggèrent une intervention majeure de ces deux composés dans la régulation de l'expression de ce gène au cours de la mise en place des réactions de défense.

Valorisation: ces résultats sont présentés dans la publication [A.14].

V.1.3 Le protéasome: régulateur de la production de Formes Actives de l'Oxygène (FAO)?

Chez le tabac, la production de FAO *via* une NADPH oxydase (appelée NtrbohD, Simon Plas et *al.*, 2002) débute quelques minutes seulement après le traitement éliciteur et persiste pendant 1 à 2 heures. Outre leur rôle dans le renforcement de la paroi végétale en réponse à l'infection, les FAO sont également impliquées dans la régulation de nombreux gènes de défense dont l'expression est modulée au cours de la mise en place des réactions de défense (Lamb et Dixon, 1997).

Ainsi, afin de confirmer l'implication des FAO (et en particulier de l'H₂O₂) dans la régulation du gène *tc17*, une collaboration a été engagée avec une autre équipe du laboratoire qui possédait des suspensions cellulaires de tabac « antisens » pour le gène de la NADPH oxydase. Ainsi, il a été montré qu'en réponse au traitement éliciteur, le gène *tc17* n'était pas induit dans ces lignées incapables de produire des FAO. Ces travaux ont permis de montrer que la production d'H₂O₂ par la NADPH oxydase (NtrbohD) était très fortement impliquée dans la régulation transcriptionnelle du gène *tc17*.

Parallèlement à ces études, la construction de lignées cellulaires de tabac sur-exprimant (sens) ou sous-exprimant (antisens) le gène *tc17* a été réalisée. La caractérisation de ces lignées par J. Lequeu

⁴ Parasiticéine : éliciteur protéique synthétisé par le champignon *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*

⁵ Tabacs transgéniques NahG8⁺ : tabacs sur-exprimant une salicylate hydroxylase, enzyme qui catabolise l'acide salicylique en catéchol

(doctorant à l'UMR), a permis de montrer, qu'en réponse à un traitement à la cryptogéine, les lignées « sens » ne produisaient quasiment plus de FAO au contraire des lignées « antisens » qui présentaient une production de FAO plus rapide et plus intense que les plantes transformées avec le vecteur vide. **Ces résultats suggèrent que l'induction du gène *tc17* est suivie d'un rétro-contrôle négatif de la NADPH Oxydase.**

Conclusion: l'ensemble de ces travaux a permis de montrer (i) que la production de peroxyde d'hydrogène au cours de la mise en place des mécanismes de défense était essentielle à l'induction du gène *tc17* et (ii) que cette induction était suivie d'un rétro-contrôle négatif au niveau de la NADPH oxydase (figure 3). Bien que les mécanismes impliqués dans ce rétro-contrôle n'aient pas été mis en évidence, on peut supposer que l'induction de la sous-unité $\beta 1$ (et/ou d'autres sous-unités) en réponse au traitement éliciteur modifie l'activité de protéasomes pré-existants qui seraient alors capables de réaliser une protéolyse ciblée des NADPH oxydases membranaires.

Valorisation: Ces travaux sont présentés dans la publication [A.7].

V.1.4 Induction d'autres sous-unités de protéasome

A ce stade de notre étude, si l'induction de la sous-unité $\beta 1$ (*tc17*) du protéasome et son intervention dans la mise en place des mécanismes de défense des plantes ne faisaient plus aucun doute, la régulation des autres sous-unités en réponse à un traitement par la cryptogéine restait à élucider. Par conséquent, en collaboration avec J. Dahan (D.E.A.), **le clonage par RT-PCR ciblée de 6 sous-unités α (1, 3, 4, 5, 6 et 7) et de 6 sous-unités β (2 à 7) de protéasome de tabac** a été réalisé. La cinétique d'expression de chacune de ces sous-unités a été suivie dans des suspensions cellulaires de tabac traitées à la cryptogéine (**Figure 5**).

Conclusions: lors de la mise en place des réactions de défense chez le tabac, seules les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 6$ et $\beta 1$ (*tc17*) sont induites (**figure 5**). Cette induction différentielle permet d'avancer l'hypothèse qu'au cours de la mise en place des réactions de défense, les sous-unités induites remplaceraient des sous-unités constitutives ($\alpha 3c$, $\alpha 6c$ et $\beta 1c$), au sein de protéasomes préexistants et permettraient ainsi l'apparition de néo-protéasomes, capables d'effectuer une protéolyse spécifique comme c'est le cas pour les « immunoprotéasomes » impliqués dans les réponses immunitaires chez les animaux (Eleuteri *et al.*, 1997).

Valorisation : Ces résultats sont présentés dans les 2 publications [A.9] et [A.12].

V.1.5 Conclusion générale

Cette étude est l'une des premières à montrer l'implication du protéasome dans la mise en place des mécanismes de défense des plantes. Toutefois, il est important de souligner que le protéasome est un complexe protéasique jouant un rôle majeur dans la réponse immunitaire chez les mammifères et en particulier, dans la présentation des peptides antigéniques par les molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité. Ainsi, même si le parallèle entre réponse immunitaire et mécanismes de défense des plantes est difficile à faire, il n'est pas exclu que certains mécanismes aient pu être conservés au cours de l'évolution. A ce titre, le protéasome, structure cellulaire ancestrale (présent chez les procaryotes unicellulaires), constitue un excellent candidat. Par exemple, il peut être supposé que les néo-protéasomes synthétisés consécutivement à la reconnaissance de l'éliciteur, soient capables de réaliser une protéolyse ciblée des protéines de l'agent pathogène afin de limiter son développement et/ou de protéines impliquées dans les phases clés de la mise en place des mécanismes de défense, telle que la NADPH oxydase (**figure 6**).

Bibliographie :

- Dahan J., Etienne P., Petitot A.S., Houot V., Blein J.P., Suty, L. (2001)** Cryptogein affects expression of alpha 3, alpha 6 and beta 1 20S proteasome subunits encoding genes in tobacco. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1947-1948.
- Eleuteri A.M., Kohanski R.A., Cardozo C., Orłowski M. (1997)** Bovine spleen multicatalytic proteinase complex (proteasome). Replacement of X, Y and Z subunits by LMP7, LMP2 and MECL1 and changes in properties and specificity. *Journal of Biological Chemistry* 272: 11824-11831.
- Etienne P., Petitot A.S., Houot V., Blein J.P., Suty L. (2000)** Induction of *tcl 7*, a gene encoding a beta-subunit of proteasome, in tobacco plants treated with elicitors, salicylic acid or hydrogen peroxide. *FEBS Letters*, 466: 213-218
- Lamb C., Dixon R.A. (1997)** the oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 251-275.
- Lequeu J., Simon-Plas F., Fromentin J., Etienne P., Petitot A.S., Blein J.P., Suty L. (2005)** Proteasome comprising a β 1 inducible subunit acts as a negative regulator of NADPH oxidase during elicitation of plant defense reactions. *FEBS letters* 579: 4879-4886.
- Petitot A.S., Blein J.P., Pugin A., Suty L. (1997)** Cloning of two plant cDNAs encoding a β -type proteasome subunit and a transformer-2-like SR-related protein: early induction of the corresponding genes in tobacco cells treated by cryptogein. *Plant Molecular Biology* 35: 261-269.
- Simon-Plas F., Elmayan T., Blein J.P. (2002)** The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant Journal* 31: 137-147.

RECHERCHE POST-DOCTORALE (ATER)

Contexte scientifique: Outre son implication dans la détoxification des formes actives de l'oxygène, le peroxysome est un organe majeur dans le maintien de l'homéostasie lipidique cellulaire puisqu'il est le siège de la dégradation des acides gras encore appelée β -oxydation (figure 7). Chez les animaux, la β -oxydation peroxysomiale est spécialisée dans la dégradation des acides gras à très longues chaînes (>22 atomes de C, principalement l'acide cérotique et l'acide lignocérique). Un dysfonctionnement de ce type de β -oxydation, lié par exemple à l'absence de peroxysome ou à l'altération de certaines enzymes peroxysomiales, peut conduire à des pathologies très graves (Wanders, 2004). Un des axes de recherche du Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (LBMC) de l'Université de Dijon porte sur l'étude de la régulation des enzymes impliquées dans la β -oxydation peroxysomiale, notamment en réponse à des molécules hypolipémiantes⁶ (proliférateurs de peroxysomes ou PPs, Dreyer et al., 1992). Lors de mon arrivée en qualité d'ATER, les études étaient centrées sur les isoformes de thiolases de souris, enzymes impliquées dans la quatrième étape de la β -oxydation peroxysomiale. L'objectif majeur de ces recherches visait à déterminer si un défaut de fonctionnement de l'une ou l'autre de ces isoformes peroxysomiales était suivi de symptômes de maladies dont les origines sont actuellement encore indéterminées.

V.2 Les thiolases peroxysomiales de souris.

(Thèse G. Chevillard, stage Maîtrise de Biochimie A. Le Nevenec)

Chez le rat, il existe deux isoformes de thiolases (ThA et ThB) principalement exprimées dans les tissus riches en peroxysomes comme les tissus hépatiques, intestinaux et dans une moindre mesure dans les tissus rénaux et le tissu adipeux blanc (TAB). Ces deux isoformes de thiolases répondent différemment aux traitements par des hypolipémiants : le gène *ThB* est fortement induit en réponse à ces traitements à la différence du gène *ThA* qui n'est pas (ou très peu) induit. Chez la souris, deux ADNc pleine longueur correspondants à deux isoformes de thiolases peroxysomiales (n° accession BC012400 et BC019882) ont également été clonées au LBMC. Toutefois, les fortes similitudes (>95%) entre ces deux séquences rendaient impossible l'étude de l'expression de ces deux isoformes. L'objectif ultime de l'équipe de recherche étant la construction de souris déficientes pour l'isoforme inductible, **la mise au point de sondes moléculaires spécifiques s'avérait impérative afin d'identifier avec certitude cette isoforme**. Ce projet de recherche m'a été confié dans le cadre de mon contrat ATER pour venir en appui de la thèse de G. Chevillard (2001-2004).

V.2.1 Obtention de sondes moléculaires spécifiques des thiolases de souris.

L'alignement des deux séquences nucléotidiques a révélé que ces séquences étaient très différentes dans les régions 3' non traduites (3'UTRs). Cette caractéristique a été utilisée pour la détermination de sondes spécifiques. Ainsi, par PCR, nous avons amplifié les séquences 3'UTRs de chacune des isoformes. Deux amplicons de 136 (pour l'isoforme BC012400) et 168 pb (pour l'isoforme BC019882) ont été obtenus. La spécificité de ces sondes a été vérifiée en réalisant des hybridations croisées de plasmides contenant les deux ADNc de thiolases. **A l'issue de ces tests, la spécificité des sondes ne faisant plus aucun doute, l'étude de l'expression des deux isoformes de thiolases pouvait alors être initiée. A partir de ce moment, les isoformes de thiolases de souris BC012400 et BC019882 sont appelées respectivement *mThA* et *mThB*, pour «mouse Thiolase A et B».**

V.2.3 Etude de l'expression des isoformes de thiolases de souris.

Expression tissulaire (figure 8): Les deux isoformes sont fortement exprimées dans les tissus hépatiques, intestinaux, rénaux et le tissu adipeux blanc, avec une proportion relative au sein de chaque tissu qui est de 60% pour l'isoforme *mThA* et 40% pour l'isoforme *mThB*. Ces résultats sont

⁶ Molécules hypolipémiantes : molécules qui font baisser le taux de lipides dans le sang

très différents de ceux mis en évidence chez le rat ou l'isoforme de la *thiolase B* est constitutivement très peu exprimée dans ces différents tissus (Bodnar et Rachubinski, 1990).

Expression en réponse aux molécules hypolipémiantes de type fénofibrate (figure 8): l'isoforme *mThB* (*BCO19882*) est fortement induite dans tous les tissus étudiés. Toutefois, l'induction la plus forte est observée dans le foie (> x10).

A l'issue de ces travaux, le caractère inductible de l'isoforme de thiolase *mThB* était enfin avéré chez la souris. En outre, sa forte induction par les molécules hypolipémiantes suggère un rôle majeur de cette enzyme dans le contrôle de l'homéostasie lipidique.

Suite à ces travaux, la construction par recombinaison homologue d'un modèle de souris possédant une invalidation du gène de la *thiolase B* (souris *mThB*^{-/-}) a été entreprise en collaboration avec la société Genoway basée à Lyon.

Valorisation: ces résultats sont présentés dans la publication [A.6].

V.2.3 Conclusion générale

Les premières souris homozygotes *mThB*^{-/-} issues de la stratégie d'invalidation du gène de *mThB* ont vu le jour en 2004. Ces souris sont viables et fertiles, et les premières études montrent qu'en réponse à un régime nutritionnel standard, l'invalidation du gène de la *mThB* n'est pas compensée par une augmentation d'expression de la *mThA*. De futures expérimentations permettront de préciser (i) les éventuelles pathologies développées par ces souris et (ii) leurs réponses aux traitements hypolipémiants. De telles études devraient permettre de mieux appréhender le rôle de cette isoforme dans le contrôle du métabolisme lipidique et son éventuelle implication dans le développement de pathologies dont les origines restent inconnues.

Bibliographie:

- Bodnar A.G., Rachubinski R.A.** (1990) Cloning and sequence determination of cDNA encoding a second rat liver peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase. *Gene* 91: 131-139.
- Chevillard G.** (2004) Etudes des 3-cétoacyl-CoA thiolases A et B peroxysomiales: clonage des gènes, régulation et génération d'un modèle de souris déficientes pour la thiolase B. *Thèse de doctorat de l'Université de Bourgogne*: 168 p.
- Dreyer C., Krey G., Keller H., Givel F., Helftenbein G., Wahli W.** (1992) Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptor. *Cell* 68: 879-887.
- Wanders R.J.A.** (2004) Metabolic and molecular basis of peroxisomal disorders: a review. *American Journal of Medicine and Genetic* 126A: 355-375.

RECHERCHE POST-DOCTORALE (Maître de Conférences)

Contexte scientifique: La réduction des fertilisants azotés apportés aux plantes de grande culture constitue aujourd'hui un enjeu économique et environnemental majeur. Dans ce contexte, le colza est une culture paradoxale dans la mesure où le solde entre les apports d'intrants azotés et l'azote contenu dans les graines est relativement élevé. Ainsi, en dépit de ses capacités élevées d'absorption de l'azote (N) minéral (principalement le nitrate), le colza se caractérise par une mauvaise efficacité d'utilisation de l'N (EUA) puisque seulement 50% de l'azote issu de la fertilisation est réellement utilisé pour le remplissage des graines (Schjoering et al., 1995). Actuellement, il est largement évoqué que cette valorisation médiocre de l'élément N serait essentiellement liée à un mauvais recyclage de l'N foliaire au cours du processus de sénescence séquentielle intervenant lors du stade végétatif. Ainsi, des travaux récents montrent qu'au cours du stade végétatif les feuilles chutent avec des teneurs en azote relativement élevées (entre 2 et 4 % de la matière sèche) comparativement à ce qui a été observé lors du stade reproducteur ou les teneurs foliaires en N résiduel atteignent des valeurs inférieures à 1% (figure 9). Outre les conséquences environnementales liées au retour important d'azote organique au sol (pouvant aller jusqu'à 140 kg.ha⁻¹), d'autres travaux ont montré que cette chute de feuilles riches en N pouvait également affecter le rendement de la culture de colza. A titre d'exemple, l'approche modélisatrice de la répartition de l'N développée par Malagoli et al. (2005) a permis de simuler qu'une diminution de la teneur en N dans les feuilles chutées à une valeur constante de 1% tout au long du cycle de culture permettrait une augmentation du rendement de près de 15%.

Ce défaut de mobilisation de l'N foliaire lors du stade végétatif pourrait avoir plusieurs origines : (i) une protéolyse non optimale au cours du processus de sénescence foliaire se déroulant notamment lors du stade végétatif, (ii) un mauvais fonctionnement des systèmes de transport des acides aminés issus de cette protéolyse ou (iii) la combinaison des deux phénomènes. Toutefois, Tilsner et al. (2005) ont montré que, chez le colza, les systèmes phloémiques de chargement des acides aminés (transporteurs) ne semblaient pas constituer le facteur limitant la mobilisation de l'N endogène foliaire. Par conséquent, il est largement suggéré que la mauvaise mobilisation de l'N endogène foliaire serait davantage la conséquence d'une protéolyse non optimale de l'N protéique au cours du processus de sénescence.

Face aux préoccupations environnementales actuelles, l'obtention de variétés de colza présentant une EUA optimale notamment en conditions de bas intrants azotés constitue une priorité. Dans ce contexte, une optimisation de la mobilisation de l'N endogène foliaire pourrait constituer une des voies d'amélioration permettant d'atteindre cet objectif. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes qui régissent le recyclage de l'N foliaire au cours du processus de sénescence constitue un pré-requis indispensable pour envisager une amélioration du bilan agro-environnemental du colza.

C'est dans ce contexte scientifique que j'ai été recruté en qualité de maître de Conférences en 2002 à l'université de Caen-Basse Normandie et que j'ai intégré, pour la partie recherche, l'équipe azote de l'UMR INRA UCBN 950, Ecophysiologie Végétale et Agronomie, nutriments N, C, S (figure 10). Depuis cette date, les projets de recherche que j'ai développés au sein de cette UMR, visent à mieux appréhender les événements moléculaires, physiologiques et protéomiques associés à la remobilisation de l'N au cours de la sénescence foliaire du colza.

V.3 Mobilisation de l'N foliaire chez *Brassica napus* L.

La sénescence marque le stade ultime de développement foliaire et se caractérise au niveau macroscopique par un jaunissement de la feuille. Au cours de ce processus, les feuilles s'engagent dans une phase de dégradation massive de leurs macromolécules (lipides, protéines, acides nucléiques et protéines). Les éléments issus de ces dégradations sont ensuite redistribués aux organes en

croissance, à savoir les jeunes feuilles lors des stades de développement végétatif ou les graines lors des stades de développement reproducteur.

Dans le cas des composés azotés, les protéines constituent le pool d'N foliaire majoritairement mobilisable. Cette mobilisation nécessite l'intervention de systèmes protéolytiques qui à ce jour, ne sont pas encore clairement identifiés.

Certains facteurs biotiques et abiotiques sont capables de moduler la progression de la sénescence foliaire et par voie de fait, la mobilisation azotée qui lui est associée. Ainsi, une carence azotée induit une sénescence foliaire précoce et une mobilisation de l'azote endogène plus efficace qui aboutit généralement à des teneurs en N dans les feuilles chutées inférieures 1%. Toutefois, les mécanismes cellulaires conduisant à cette optimisation de la mobilisation azotée restent méconnus.

Ainsi, l'objectif principal de mes recherches développées à l'UMR EVA, vise à mieux comprendre les mécanismes cellulaires qui conditionnent la mobilisation de l'N au cours de la sénescence foliaire du colza. L'impact d'une privation ou d'une carence azotée sur la régulation de ces mécanismes est également largement abordé.

V.3.1 Indicateurs moléculaires de la progression de la sénescence foliaire (D.E.A et thèse J. Gombert)

L'étude de la sénescence foliaire nécessite de pouvoir caractériser finement l'état d'avancement de ce processus. Les teneurs en chlorophylles et en protéines solubles sont des indicateurs métaboliques couramment utilisés pour juger de l'état d'avancement de la sénescence foliaire. Toutefois, la pertinence de ces indicateurs est partiellement controversée notamment à cause de leur manque de précocité par rapport à l'initiation de la sénescence. Ainsi, Buchanan et Ainsworth (1997) montrent que préalablement à l'hydrolyse des macromolécules, l'expression de nombreux gènes spécifiques de la sénescence est modifiée (*SAGs: Senescence Associated Genes* et *SDGs: Senescence Down-regulated Genes*). C'est le cas du gène *SAG12* (*SAG*) codant une protéase à cystéine, et du gène *Cab* (*SDG*) codant une protéine de liaison aux chlorophylles a/b) dont l'expression est respectivement augmentée et diminuée au cours des phases précoces de la sénescence foliaire. Afin de déterminer si ces gènes pouvaient être utilisés comme indicateurs de sénescence chez le colza, nous avons suivi leur expression en situation de sénescence naturelle (+N) et de sénescence induite par une privation en azote (-N).

Expression des gènes dans un rang foliaire donné (figure 11): L'expression des gènes a été suivie dans un rang foliaire dont l'état de sénescence a été préalablement caractérisé (en situation +N et -N) en utilisant les indicateurs métaboliques classiques. En situation +N, lorsque les teneurs en azote de la feuille chutent, l'expression du gène *Cab* (jusqu'alors très exprimé) est fortement réprimée et celle du gène *SAG12* (jusqu'à présent non exprimé) induite. En situation -N, la répression du gène *Cab* et l'induction du gène *SAG12* sont plus précoces. Ces modifications d'expression en situation de carence N coïncident avec la chute plus précoce des quantités d'N foliaire (**figures 11A et C**). Ainsi, nous avons montré que l'évolution cinétique des quantités de transcrits de ces gènes permet de déterminer une date théorique d'entrée en sénescence de la feuille étudiée. Les résultats obtenus montrent que cette date est d'autant plus précoce que la plante est privée en N (**figures 11B et D**).

Expression des gènes sur l'axe de la plante (figure 12): les profils d'expression des gènes *SAG12* et *Cab* ont été déterminés, à un temps donné, sur l'ensemble des rangs foliaires. Les feuilles les plus âgées (feuilles basales) se caractérisent par une forte expression de *SAG12* et une faible expression du gène *Cab* contrairement aux feuilles les plus jeunes (feuilles de l'apex) qui présentent une forte expression du gène *Cab* mais n'expriment pas le gène *SAG12*. Ces différences d'expression entre rangs foliaires mettent en évidence la progression acropète de la sénescence foliaire qui intervient au cours du développement végétatif du colza. Ainsi, à un temps donné, la représentation graphique des quantités de transcrits de ces deux gènes en fonction de la position nodale, permet de

déterminer le dernier rang foliaire théorique sénéscent sur l'axe de la plante caractérisé par une augmentation de l'expression du gène *SAG12* concomitante à une diminution de l'expression du gène *Cab* (**figure 12A**). Après détermination de ce rang foliaire théorique à différentes dates de récolte, il devient alors possible de déterminer une vitesse de progression de la sénescence foliaire en fonction du traitement (+N ou -N; **figure 12B**).

Conclusion: les modulations d'expression des gènes *SAG12* et *Cab* consécutives à l'entrée en sénescence d'une feuille constitue un indicateur pertinent et fiable pour (i) suivre la progression spatio-temporelle de la sénescence foliaire (ii) estimer l'impact de facteurs environnementaux (exemple carence N) sur la progression de ce processus.

Valorisation: ces résultats sont présentés dans la publication: [A.6].

V.3.1 Régulation de la sénescence foliaire en réponse à une privation en N

(M2R L. Dubousset, thèse M. Desclos et collaboration avec F. Lecahérec APBV Rennes 1)

La privation nutritionnelle azotée est un des facteurs environnementaux qui conduit à l'accroissement de la remobilisation de l'azote foliaire (Gombert et al., 2006). Afin de mieux appréhender les mécanismes sous-jacents à cette meilleure mobilisation du N chez le colza, les effets d'une privation en N sur la progression de la sénescence ont été étudiés.

V.3.1.1 Impact de la privation N sur la progression de la sénescence foliaire du colza

La progression de la sénescence foliaire de plants de colza au stade rosette, privés (-N) ou non (+N) en azote pendant 21 jours a été finement caractérisée en utilisant les indicateurs *SAG12/Cab*. Ainsi, en réponse à cette privation, il a été mis en évidence que (**figure 13**):

- **les feuilles les plus âgées** (déjà présentes lors de l'application de la privation en N) ont **une vitesse de sénescence** accélérée par rapport aux mêmes feuilles des plantes témoins. Ainsi, en réponse à une privation en N, la vitesse de progression de la sénescence des feuilles âgées est multipliée par 2,5 (0,317 rang.jour⁻¹ pour les plantes +N contre 0,123 rang.jour⁻¹ pour les plantes -N). Comparativement aux plantes témoins (+N), ces feuilles présentent **une chute des teneurs en chlorophylles et des quantités de protéines solubles plus précoces**.

- **les feuilles les plus jeunes** (émises lors de la privation en N) ont **une vitesse de sénescence ralentie** par rapport à leurs homologues présentes sur les plantes témoins. A titre d'exemple, la feuille n°7, jeune feuille émise pendant la privation (-N) présente, comparativement à la même feuille de plantes témoins (+N), une vitesse de sénescence très réduite (0,020 rang.jour⁻¹) corrélée à **un maintien des quantités de protéines solubles et des teneurs en chlorophylles**.

Les comportements foliaires très contrastés en réponse à la privation en N, suggèrent la mise en place d'une régulation fine des processus de sénescence et de la dégradation de l'N protéique qui lui est associée. En effet, nos résultats permettent d'avancer l'hypothèse qu'en situation de contrainte azotée, la mobilisation de l'N des feuilles âgées est privilégiée afin d'alimenter le métabolisme des jeunes feuilles en croissance. Par ailleurs, le retard de sénescence ainsi que le maintien des quantités de protéines et des teneurs en chlorophylles observés chez ces jeunes feuilles suggèrent la mise en place de mécanismes destinés à préserver la fonctionnalité de ces organes afin d'assurer la survie de la plante dans l'attente de conditions d'alimentation en N plus favorables. Dans ce contexte, mes travaux de recherche se sont focalisés sur l'identification du(es) mécanisme(s) responsable(s) du retard de sénescence et/ou du maintien de la fonctionnalité des jeunes feuilles en situation de contrainte azotée.

V.3.1.2 Les inhibiteurs de protéases : une voie de régulation potentielle ?

Parmi les voies de régulation potentielles de la progression de la sénescence, l'intervention d'inhibiteurs de protéases, capables de moduler l'activité de certaines protéases, est souvent évoquée dans la littérature. A titre d'exemple, Sugarawa et al. (2002) suggèrent que des inhibiteurs de protéases à cystéine (DC-CPI) agiraient comme répresseurs de la sénescence florale chez *Dianthus caryophyllus*. Par ailleurs, chez le colza soumis à un stress hydrique (connu pour accélérer la sénescence foliaire notamment des feuilles âgées), l'accumulation d'une protéine, appelée BnD22, présentant de fortes homologues avec des inhibiteurs de protéases à sérine de type Kunitz, a été mise en évidence dans les jeunes feuilles présentant une activité protéolytique réduite (Reviron et al., 1992 ; Ilami et al., 1997). Ainsi, ces auteurs suggèrent que les inhibiteurs de protéases seraient capables de contrôler la protéolyse associée au processus de sénescence en inhibant ou en différant l'action de certaines protéases.

Par conséquent, dans le cadre de notre étude, une approche protéomique ciblée sur la recherche d'inhibiteurs de protéases a été réalisée. L'utilisation d'électrophorèses monodimensionnelles (1DE) a révélé que, comparativement aux jeunes feuilles de plantes témoins (+N), les jeunes feuilles privées en N accumulaient plus fortement et surtout pendant une durée plus longue (28 jours contre seulement 14 chez les plantes +N) une protéine à 19 kDa (**figure 14A**). Compte-tenu des résultats précédemment obtenus par Reviron et al. (1992) en réponse au stress hydrique, la recherche d'activité inhibitrice de protéases à sérine a été réalisée par zymogramme 1DE. **Ainsi, une activité inhibitrice de protéases à sérine à 19 kDa, proportionnelle au niveau d'accumulation de la protéine à 19 kDa, a été mise en évidence (figure 14B)**. Afin d'identifier la protéine à 19 kDa, une approche comparative de profils protéiques a été conduite par électrophorèses bidimensionnelles (2DE). Toutefois, la faible abondance de cette protéine (par rapport à d'autres protéines telles que la RuBisCo) a rendu cette identification difficile à partir des gels 2DE de feuilles privées ou non en N. Par conséquent, nous avons eu recours à un traitement au méthyl jasmonate (MeJA), une phytohormone connue d'une part pour accélérer la progression de la sénescence foliaire chez le colza (Rossato et al., 2002) et d'autre part, pour induire les inhibiteurs de protéases (Farmer et Ryan, 1992 ; Sanchez-Hernandez et al., 2004). L'analyse des profils 2DE a révélé que **la protéine accumulée à 19 kDa dans les feuilles traitées au MeJA (figure 15A) correspondait finalement à 2 spots protéiques avec des pI de 5 et 5,1 (figure 15B)**. En outre, grâce à la réalisation d'un zymogramme 2D nous avons montré pour la première fois, que **la protéine BnD22 était à l'origine de l'activité inhibitrice de protéases à sérine de type Kunitz à 19 kDa (figure 15C)** précédemment mise en évidence par zymogramme 1D. Après séquençage par ESI-LC MS/MS, il s'est avéré que **les deux polypeptides correspondaient à la protéine BnD22 (figure 15D)** précédemment identifiée par Reviron et al. (1992). Par la suite, l'accumulation de ces deux polypeptides dans les jeunes feuilles de colza privé en N a été confirmée par séquençage des spots protéiques correspondants.

Enfin, l'étude de l'activité inhibitrice de protéases (BnD22) a été réalisée sur l'ensemble des rangs foliaires des plantes (+N) et (-N). Quel que soit le traitement, il a été mis en évidence que cette activité est d'autant plus faible que la feuille est âgée. Par ailleurs, **les feuilles âgées de plantes (-N), dont la progression de la sénescence est accélérée, présentent une activité inhibitrice de protéases beaucoup plus faible que leurs homologues issues de plantes témoins. A l'inverse, les jeunes feuilles de plantes (-N), dont la progression de la sénescence est ralentie, présentent une activité inhibitrice de protéases beaucoup plus forte que les jeunes feuilles de plantes témoins.** Ainsi, ces résultats montrent l'existence le long de l'axe de la plante, d'un gradient d'activité inhibitrice de protéases (**BnD22**) inverse au gradient acropète de sénescence qui pourrait pour partie expliquer le retard de sénescence des jeunes feuilles privées en azote accumulant la protéine BnD22.

V.3.1.3 BnD22 et la protection des chlorophylles

Chez le colza, la protéine BnD22 est également connue pour être une protéine de liaison aux chlorophylles encore appelée « Water Soluble Chlorophyll binding Proteins » ou WSCPs. Au niveau fonctionnel, ces protéines forment des complexes avec les chlorophylles et protègent ces dernières de la dégradation (Schmidt *et al.*, 2003 ; Horigome *et al.*, 2007).

Dans le cadre de notre étude, l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre la WSCP de *Brassica oleracea* (collaboration avec F. Lecahérec, Rennes et H. Satoh, Japon) sur des Western-blot obtenus après 2DE, a permis de confirmer que les deux spots protéiques BnD22 (pI 5 et 5,1) correspondent à des WSCPs. Cette fonction WSCP putative de BnD22 participerait au maintien des capacités photosynthétiques des jeunes feuilles (notamment lors d'une privation en N) en protégeant les chlorophylles de la dégradation.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent que la protéine BnD22 induite dans les jeunes feuilles (et particulièrement celles privées en N), présente potentiellement une double fonction « inhibiteur de protéases/WSCP » et participerait ainsi à la régulation de la protéolyse et/ou à la protection des chlorophylles au sein de ces tissus.

Conclusion: en réponse à une carence N, l'accélération de la sénescence des feuilles matures coïncide avec la diminution précoce de la quantité de protéine BnD22 et de l'activité inhibitrice de protéases qui lui est associée. A l'inverse, les jeunes feuilles qui accumulent cette protéine, présentent une forte activité inhibitrice de protéases. Par ailleurs, BnD22 présente également une fonction WSCP putative qui pourrait intervenir dans le maintien des capacités photosynthétiques des jeunes feuilles. Ainsi, en situation de stress nutritionnel N, la double fonction «inhibiteur de protéases/WSCP» de BnD22 permettrait un maintien de la fonctionnalité des feuilles en croissance, retardant ainsi l'entrée en sénescence de ces tissus essentiels à la survie de la plante.

Enfin, je conclurai ce paragraphe en proposant une nouvelle terminologie pour définir les inhibiteurs de protéases et plus particulièrement BnD22 qui a largement été abordé au cours de ces études. En effet, dans la littérature, ces inhibiteurs de protéases sont le plus souvent considérés comme des régulateurs de la sénescence (foliaire ou autre). Toutefois, l'ensemble des résultats obtenus au cours de ces travaux suggèrent qu'ils seraient davantage impliqués dans le maintien de la fonctionnalité des jeunes tissus que dans la régulation de la sénescence proprement dite. En effet, dans la mesure où ces inhibiteurs ne sont plus (ou quasiment plus) présents lorsque le processus de sénescence est engagé, je propose de les définir comme des facteurs de juvénilité capables de prolonger la fonctionnalité des jeunes tissus dans l'attente de conditions plus favorables.

Valorisation: ces résultats sont présentés dans 2 publications : [A.3] et [A.5]

V.3.2 Les systèmes protéolytiques associés à la mobilisation de l'N (Thèse M. Desclos)

Si les inhibiteurs de protéases constituent une piste de recherche intéressante permettant pour partie d'expliquer la modulation de la date d'entrée en sénescence de certains tissus (et particulièrement des jeunes feuilles lors d'une contrainte azotée), ils ne renseignent toutefois en rien sur les systèmes protéolytiques impliqués dans la dégradation de l'azote protéique au cours des stades de développement ultime de la feuille. Chez le colza, l'identification de ces systèmes protéolytiques demeure une priorité surtout si l'on considère qu'une amélioration de l'EUA du colza passe par une optimisation de la protéolyse associée à la sénescence foliaire. C'est pourquoi, partant du postulat qu'au cours du processus de sénescence, les protéases d'intérêts sont régulées positivement au niveau traductionnel, une approche protéomique ciblée sur les protéines induites (ou dont la vitesse de dégradation est inférieure à la vitesse de dégradation de la majorité des protéines) a été réalisée à partir d'un rang foliaire mature issu de plantes cultivées sous 3 niveaux de fertilisation azotée différents à savoir 4(HN), 0,4 (LN) et 0 mM (ON) de nitrate.

V.3.2.1 Effets des traitements sur la mobilisation de l'N foliaire et les paramètres de sénescence

Les différents niveaux de fertilisation azotée (HN, LN et ON) ont été appliqués afin d'obtenir, à une même date de récolte, des états de sénescence contrastés pour une même feuille, à savoir une feuille mature au début de l'application des traitements. Ainsi, en préalable à l'étude protéomique, les effets des différents niveaux de fertilisation azotée sur la quantité d'N endogène mobilisé (utilisation de traceur ^{15}N), la date théorique d'entrée en sénescence ainsi que l'évolution des teneurs en chlorophylles et des quantités de protéines totales ont été déterminés:

Effet sur la quantité d'azote endogène mobilisé: Comme le montre la **figure 16**, la quantité d'N endogène mobilisé au sein de la feuille 8 est d'autant plus importante que la contrainte azotée est forte. Ainsi, après 28 jours de traitements, les quantités d'azote endogène mobilisé s'élèvent respectivement à 7,3, 9,1 et 9,4 mg d'N pour les traitements HN, LN et ON. Cette mobilisation est d'autant plus précoce que la contrainte azotée est forte. Ces résultats sont en accord avec les travaux précédemment réalisés au laboratoire (Gombert et *al.*, 2006) montrant que chez le colza, la mobilisation de l'N foliaire endogène est d'autant plus importante que la disponibilité en azote est faible.

Effets sur les paramètres de sénescence: Pour chaque traitement, la date d'entrée théorique en sénescence ainsi que l'évolution des teneurs en chlorophylles et des quantités de protéines totales de la feuille 8 ont été déterminés. Ainsi, les résultats obtenus montrent que la date d'entrée en sénescence de la feuille 8 (déterminée à l'aide des indicateurs moléculaires *SAG12/Cab*) est d'autant plus précoce que la carence azotée est sévère: 26 J pour le traitement HN contre 15 et 10 J respectivement pour les traitements LN et ON (**figure 17**). Les résultats présentés **figures 17A et B** montrent qu'au sein de la feuille 8 témoin (HN), les teneurs en chlorophylles et les quantités de protéines totales chutent significativement entre 21 et 28 J. Comparativement au témoin, la chute des teneurs en chlorophylles et des quantités de protéines totales en réponse aux traitements ON et 0,4N est à la fois beaucoup plus précoce et plus intense. A titre d'exemple, après 28 J, les quantités de protéines totales ont chuté de 80% en réponse à une carence N (ON ou LN) contre seulement 50% dans la feuille témoin (**figure 17B**).

Les résultats présentés ci-dessus montrent que les différents niveaux de fertilisation azotée ont permis d'obtenir des états de sénescence contrastés des feuilles matures. C'est à partir de ces feuilles que l'approche protéomique visant à identifier les protéines induites au cours de la sénescence, et plus particulièrement les systèmes protéolytiques, a été réalisée.

V.3.2.2 Principaux résultats de l'étude protéomique

L'objectif principal de cette étude étant d'identifier les systèmes protéolytiques impliqués dans la dégradation des protéines au cours des stades ultimes du développement de la feuille, pour chaque traitement, le profil protéique bidimensionnel correspondant au temps de cinétique précédent la chute significative des protéines totales a été défini comme le point de départ de l'analyse protéomique comparative. Par conséquent, les comparaisons ont été réalisées à partir du 14^{ème} J pour la feuille 8 HN et à partir du 7^{ème} J pour les feuilles 8 LN et ON. Les profils protéomiques bidimensionnels obtenus aux différents temps de cinétique, c'est-à-dire à 14, 21 et 28 J pour le traitement HN et à 7, 14, 21 et 28 J pour les traitements LN et ON, sont disponibles dans la publication [A.1].

Les comparaisons de ces profils protéomiques ont permis d'identifier **55 protéines induites** (ou peu dégradées) au cours des stades ultimes du développement de la feuille mature de colza, dont la majorité sont impliquées dans le métabolisme énergétique ou encore la détoxification des formes actives de l'oxygène (**figure 18**). Ces résultats sont en accord avec les travaux qui montrent que la

sénescence foliaire s'accompagne de nombreux bouleversements métaboliques (Zimmerman et Zentgraf, 2005) tels que des modifications du statut redox (production de FAO) et des réorientations du métabolisme énergétique (par exemple *via* le cycle du glyoxylate) afin d'assurer la synthèse d'énergie, essentielle au fonctionnement des enzymes impliquées dans le catabolisme des macromolécules (De bellis et *al.*, 1990). La liste exhaustive de ces protéines est consultable dans la publication [A.1]. Enfin parmi ces 55 protéines, **quatre** correspondent à **des protéases induites** au cours des stades ultimes de développement de la feuille. Ainsi, nous avons pu identifier (**figure 19A**):

- **une protéase à aspartate** ($pI_{théorique}$ 5,1 ; $MM_{théorique}$: 54,2 kDa) : induite entre 14 et 21 J en réponse aux traitements LN et ON, c'est-à-dire après la date d'entrée théorique en sénescence et durant une phase de dégradation massive des protéines. Cette protéase est accumulée jusqu'à la fin de la cinétique (**figure 19B**). Ces résultats sont en accord avec des travaux précédents qui ont montré que le gène correspondant à cette protéase à aspartate est fortement induit dans des feuilles sénescentes de *Brassica napus* (Buchanan-Wollaston et Ainsworth, 1997).

- **une protéase chloroplastique FtSH8** ($pI_{théorique}$ 5,8 ; $MM_{théorique}$: 76 kDa) : induite entre 7 et 14 J et entre 21 et 28 J respectivement en réponse aux traitements LN et HN, c'est-à-dire durant une phase où la dégradation des protéines et des chlorophylles est effective. La quantité de cette protéine chute en fin de cinétique (**figure 19 B**) lorsque les teneurs en protéines totales atteignent des valeurs faibles. Ces protéases chloroplastiques, dont l'induction a également été observée lors de la sénescence foliaire chez le pois, pourraient participer à la dégradation des protéines du photosystème II (Schiltz et *al.*, 2004).

- **une sous-unité $\beta 1$ de protéasome CCI7** ($pI_{théorique}$ 5,3 ; $MM_{théorique}$: 25,1 kDa) : induite entre 14 et 21 J en réponse aux traitements LN et ON, cette sous-unité de protéasome est accumulée jusqu'à la fin de la cinétique (**figure 19 B**). Cette sous-unité $\beta 1$ du protéasome 20S de plante correspond à celle qui a largement été étudiée lors de ma thèse (voir p.17). Par conséquent, bien que son rôle dans la sénescence reste à ce jour inconnu, l'hypothèse d'une induction spécifique de cette sous-unité en vue d'effectuer une protéolyse ciblée peut être émise. Par ailleurs, il n'est pas à exclure que son induction s'accompagne de l'élaboration de néo-protéasomes qui pourraient intervenir comme régulateurs potentiels de la production de formes actives de l'oxygène *via* le rétrocontrôle de NADPH oxydases membranaires (voir p.19).

- **une protéase à cystéine SAG12-1** ($pI_{théorique}$ 6.9 ; $MM_{théorique}$: 38,1 kDa) : fortement induite entre 21 et 28 J en réponse aux traitements LN et ON, cette protéase est le produit d'un des deux gènes *SAG12* du colza (*SAG12-1* et *SAG12-2*). Le(s) gène(s) *SAG12*, identifié(s) chez de nombreuses espèces végétales, est considéré comme l'un des gènes spécifiques (SAGs) de la sénescence (Buchanan-Wollaston et Ainsworth, 1997; Guo et *al.*, 2004, Parrot et *al.*, 2007). Toutefois, notre étude est la première à montrer l'induction de la protéine *SAG12* lors des phases ultimes du développement foliaire. Des travaux récents réalisés chez *Arabidopsis thaliana* ont montré que (i) cette protéase était localisée au sein de petites vacuoles formées au cours de la sénescence foliaire (SAVs: Senescence Associated Vacuoles) et (ii) que sa présence ne semblait pas essentielle au bon déroulement de ce processus (Otegui et *al.*, 2005). Toutefois, en dépit de ces résultats, l'induction tardive (c'est-à-dire à une période où les quantités de protéines totales sont faibles) mais intense (X17) de cette protéase au cours de notre étude suggère qu'elle pourrait jouer un rôle déterminant dans la dégradation de protéines résistantes à la protéolyse (comme par exemple d'autres protéases) et/ou difficilement accessibles (protéines insérées dans les membranes) lors des stades tardifs de la sénescence foliaire.

Conclusion : L'approche protéomique développée au cours de cette étude a permis pour la première fois chez le colza, d'identifier 4 protéases induites au cours du processus de sénescence foliaire. De plus, quelle que soit la protéase considérée, l'induction intervient toujours après la date théorique d'entrée en sénescence (**figure 19 B**). Cette dernière constatation s'avère capitale pour mieux

comprendre les processus de mobilisation de l'azote foliaire au cours des stades ultimes de développement de la feuille. En effet, l'évolution des quantités en protéines totales au cours de la période qui précède cette date théorique (c'est-à-dire la maturité de la feuille jusqu'à la date d'entrée en sénescence), révèle qu'environ 40% des protéines totales sont mobilisées alors qu'aucune protéase n'est induite. Ces résultats suggèrent que durant cette période, la mobilisation protéique ne nécessiterait pas d'induction de protéase spécifique. Au contraire, durant la période suivante, qui s'étend de la date d'entrée en sénescence jusqu'à l'abscission, la mobilisation protéique (60% restant) nécessiterait, quant à elle, l'intervention des systèmes protéolytiques mis en évidence au cours de notre étude. Ainsi, à l'issue de ces travaux, **l'hypothèse de l'existence de deux phases de mobilisation distinctes au cours des stades ultimes de la vie de la feuille** (l'une correspondant à la mobilisation de protéines facilement mobilisables et l'autre à la mobilisation de protéines nécessitant l'induction de protéases), peut être émise.

Valorisation: ces résultats sont présentés dans la publication [A-1].

V.3.2 La mobilisation de l'N associée à la sénescence foliaire: un processus diphasique ? **(Thèse M. Desclos et collaboration avec F. Lecahérec APBV Rennes 1)**

Comme nous venons de le voir, l'étude précédente suggère largement l'existence de deux phases distinctes de mobilisation de l'N au cours des stades ultimes du développement foliaire. Dans ce contexte, une étude fine des processus physiologiques, biochimiques et moléculaires associés à la mobilisation de l'N foliaire chez le colza a été conduite afin de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse d'une organisation diphasique de cette période de mobilisation. Par ailleurs, l'impact d'une privation en azote sur l'évolution de ces différents processus a également été évalué.

V.3.2.1 Mobilisation de l'N au cours de la sénescence foliaire naturelle

Au sein d'un rang foliaire mature de colza (feuille dont la croissance a été suivie de l'émergence jusqu'à l'abscission), la présente étude a consisté (i) à suivre l'évolution de différents paramètres physiologiques, biochimiques et moléculaires (évolution des teneurs en N et en chlorophylles, des quantités de protéines, d'acides aminés, de l'expression de transporteurs d'acides aminés et des activités protéolytiques totales et spécifiques), et (ii) à établir leur chronologie, par rapport à la date théorique d'entrée en sénescence, durant la période allant de la maturité jusqu'à l'abscission de la feuille. Ainsi, deux phases de mobilisation distinctes ont pu être mises en évidence :

- **phase 1: de la maturité jusqu'à la date théorique d'entrée en sénescence (figure 20):** cette période qui débute à 489 °J (maturité de la feuille) et se termine à 727 °J (date théorique d'entrée en sénescence de la feuille), se caractérise par une mobilisation rapide du nitrate foliaire (non montré) et une chute des teneurs en chlorophylles et d'N total d'environ 40% (par rapport aux valeurs initiales à maturité, **figures 20A et B**). Durant cette période, une chute des quantités de protéines solubles a également été enregistrée. A la date d'entrée théorique en sénescence, la quantité de protéines solubles ne représente plus que 50% de la quantité initiale (**figure 20C**). Ce résultat est en accord avec ceux précédemment obtenus lors de l'étude protéomique et suggère une dégradation protéique active (associée probablement à un arrêt de synthèse) durant cette période. Par ailleurs, une chute des teneurs en acides aminés libres (AA) d'environ 20% a également été enregistrée alors que l'expression des systèmes de transports d'AA de type *BnAAP1* restent stables durant cette période (**figure 20E**).

Enfin, au cours de cette période, nous avons montré (i) que les activités protéasiques totales (*in vitro*) étaient maintenues constantes (**figure 20D**) et (ii) qu'aucune protéase spécifique (zymmogramme) n'était induite (**figure 21**). Ces résultats confirment l'absence d'induction de protéase spécifique observée lors de l'étude protéomique et suggèrent qu'au cours de cette période, les systèmes protéolytiques et les systèmes de transport d'acides aminés constitutifs suffisent à

assurer respectivement la dégradation de 50% du pool total de protéines solubles et le transport des produits issus de ces dégradations. L'efficacité de ces systèmes protéolytiques constitutifs pourraient s'expliquer par une diminution de la quantité d'inhibiteurs de protéases (de type BnD22) lorsque la feuille atteint sa maturité. A titre d'exemple, l'expression du gène codant la protéine BnD22 est diminuée d'un facteur 7 entre 366 et 489 °J (*i.e* avant la maturité) et reste très faible lors de la période post-maturité.

- **phase 2: de la date théorique d'entrée en sénescence à l'abscission de la feuille:** au cours de cette période qui s'étend de la date théorique d'entrée en sénescence (727 °J) jusqu'à l'abscission de la feuille (933 °J), les teneurs en chlorophylles ainsi que les quantités d'N total, de protéines et d'AA chutent drastiquement et ne représentent plus qu'environ 10 % des valeurs initiales au moment de la chute de la feuille. Par ailleurs, une augmentation constante de l'expression du gène *BnAAP1* (figure 20E) et des activités protéolytiques totales (**figure 20D**) à pu être observée au cours de cette période de mobilisation intense. L'analyse des activités protéolytiques spécifiques par zymogrammes à permis de révéler une plus forte activité des protéases constitutives (aux environs de 76 kDa) ainsi que l'induction, dès la date théorique d'entrée en sénescence, de deux activités protéasiques à 99 et 101 kDa (**figure 21**).

V.3.2.2 Impact d'une privation en N sur les deux phases de mobilisation de l'N foliaire

D'une manière générale, l'application de la privation en N a provoqué une chute prématurée de la feuille dont l'abscission a eut lieu à 876°J contre 933 °J chez le témoin. Cette diminution de la durée de vie de la feuille se traduit par une diminution de la période de mobilisation de l'N (phase 1 + phase 2) qui passe de 444 °J pour la feuille témoin à 387 °J pour la feuille privée en N (**figure 20**). Toutefois, il est à noter que la quantité d'azote résiduelle dans la feuille privée en N (2,02 mg) est significativement plus faible que celle de la feuille témoin (2,65 mg). Ces résultats montrent, qu'en dépit d'une période de mobilisation plus courte, la privation en N a permis une meilleure valorisation de l'N foliaire. Face à ce constat, une approche similaire à celle présentée ci-dessus a été conduite afin de mieux appréhender l'impact de la privation en azote sur les deux phases associées à la mobilisation de l'azote foliaire.

A l'issue de cette étude, aucune différence majeure n'a été observée en ce qui concerne la nature et la chronologie des événements relatifs à chacune des phases de la mobilisation de l'N. Les seules différences notables concernent l'amplitude de chacune des phases et l'intensité des activités protéolytiques qui leur sont associées. Ainsi, en réponse à la privation en N, nous avons mis en évidence que :

-**la durée de la phase 1** (de la maturité jusqu'à la date théorique d'entrée en sénescence) est beaucoup plus courte puisqu'elle ne dure que 83 °J contre 238 °J pour la feuille témoin. Cependant, les proportions de composés mobilisés restent identiques à celles de la feuille témoin : la totalité du nitrate, 40% des chlorophylles et de l'azote total, 20% des acides aminés et 50% des protéines solubles (**figures 20A, B, C et E**). Par ailleurs, l'analyse des activités protéasiques a révélé que, comparativement à la feuille témoin, les activités protéolytiques totales étaient sensiblement plus fortes (**figure 20D**) sans qu'aucune induction d'activité protéolytique autre que celle présente constitutivement (76kDa) n'ait été mise en évidence (**figure 21**). Par conséquent, la période de mobilisation des composés facilement mobilisables associée à la phase 1 serait optimisée du fait d'une plus forte activité des protéases constitutives. Compte tenu des résultats présentés au paragraphe 3.1.2 (p.26), cette augmentation d'activité des systèmes protéolytiques constitutifs pourrait être la conséquence de la diminution précoce de la quantité d'inhibiteur de protéases observée dans les feuilles matures issues de plantes privées en N.

-**la durée de la phase 2** (de la date théorique d'entrée en sénescence jusqu'à l'abscission) est significativement plus longue puisqu'elle dure 304 °J contre seulement 206 °J pour la feuille témoin.

Par ailleurs, cette phase se caractérise par une induction rapide et intense des activités protéolytiques spécifiques (**figure 21**) précédemment identifiées (99 et 101 kDa) associée à une forte activité des systèmes protéolytiques constitutifs (**figure 20D**). Comparativement à la situation témoin, la conjonction de ces deux paramètres conduit à un meilleur recyclage des composés azotés. A titre d'exemple, les quantités résiduelles de protéines solubles dans la feuille privée en N ne représentent plus que 2 à 3% de la quantité initiale contre 6 à 7 % dans la feuille témoin (**figure 20C**). Cette optimisation de la mobilisation des composés azotés au cours de cette phase permet d'expliquer la quantité d'N foliaire résiduel plus faible observée en réponse à une privation en N (2,02 mg contre 2,65 mg dans la feuille témoin).

Conclusion: L'ensemble de ces résultats confirme le **caractère diphasique de la période de mobilisation de l'azote foliaire au cours des stades ultimes du développement foliaire**. Ainsi, la phase 1, qui s'étend de la maturité jusqu'à la date théorique d'entrée en sénescence, se caractérise par la mobilisation de composés azotés facilement mobilisables, tels que le nitrate, une partie des AA et des protéines solubles (sans doute cytoplasmiques) *via* l'intervention de systèmes protéolytiques constitutifs. Au contraire, la phase 2, qui s'étend de la date théorique d'entrée en sénescence se caractérise quant à elle, par une mobilisation de composés (essentiellement protéiques) probablement non accessibles pendant la phase 1 (telles que des protéines membranaires libérées dans le cytoplasme suite à la perte d'intégrité de certains organites). La dégradation de ces composés nécessiterait une augmentation de l'activité des systèmes protéolytiques constitutifs ainsi qu'une induction de protéases spécifiques conjointement à une augmentation d'expression des systèmes de transports d'AA. De plus, les résultats obtenus en réponse à la privation en N montrent clairement qu'en dépit d'une durée totale de mobilisation plus courte, une meilleure valorisation de l'azote endogène peut être envisagée par une modulation de l'amplitude des phases 1 et 2, respectivement raccourcie et allongée. Par ailleurs, les résultats obtenus montrent que la durée de la phase 1 est d'autant plus courte que la quantité d'inhibiteurs de protéases est faible au moment de la maturité de la feuille. Face à ce constant, il peut être suggéré **que le ratio protéases/inhibiteurs de protéases au moment de la maturité de la feuille pourrait être un facteur conditionnant l'efficacité des systèmes protéolytiques constitutifs** impliqués dans la mobilisation de l'N au cours de cette phase.

La compilation des données obtenues au cours de cette étude et de celles obtenues lors des études précédentes permet d'avoir une vision intégrée (i) des principaux événements associés à la mobilisation de l'N foliaire et (ii) des modifications majeures conduisant à une optimisation de la mobilisation de l'N endogène chez le colza (**figure 22**). Actuellement, des travaux visant à établir le lien potentiel entre les systèmes protéolytiques induits au cours de la phase 2 et les protéases identifiées au cours de l'étude protéomique sont en cours. Ces travaux devraient permettre de déterminer si les 4 protéases (étude protéomique) induites au cours de la phase 2 interviennent de manière déterminante dans la mobilisation de l'N foliaire chez le colza.

Valorisation: Les principaux résultats sont soumis pour publication: [S.1].

V.3.3 Conclusion générale

V.3.3.1 Des indicateurs potentiellement utilisables pour la sélection variétale?

Outre le fait d'avoir enrichi nos connaissances fondamentales concernant les processus impliqués dans la mobilisation de l'N associée à la sénescence foliaire, ces différentes études ouvrent des pistes intéressantes pour la recherche de nouvelles variétés de colza présentant une meilleure gestion de l'azote endogène. En effet :

- les études de la mobilisation de l'N au cours de la sénescence d'un rang foliaire mature (privé ou non en N) ont révélé que la conjonction d'une sénescence précoce, d'une protéolyse rapide et intense et d'une augmentation de la durée de la phase 2 de mobilisation de l'azote endogène conduisait à de

faibles teneurs en N résiduel dans les feuilles chutées. Il devient alors possible d'envisager que des variétés de colza possédant tout ou partie de ces caractéristiques présenteraient une meilleure EUA. Dans ce contexte, l'indicateur *SAG12/Cab*, qui marque la transition entre les phases 1 et 2 de mobilisation, pourrait alors constituer un outil de choix pour le criblage de variétés de colza présentant des phases de mobilisation de l'N (phases 1 et/ou phase 2) contrastées.

- l'identification de protéines susceptibles de conditionner l'efficacité de mobilisation de l'N foliaire (protéases ou inhibiteurs de protéases) pourrait également aboutir à une stratégie de «protéines candidates». Le cas échéant, il conviendrait de vérifier si les variations génotypiques d'expression de ces protéines peuvent être mises en relation avec les variations de caractères agronomiques tels que l'EUA ou encore la faible teneur en N des feuilles chutées. Si tel est le cas, la cartographie de gènes codant ces protéines d'intérêts pourraient ainsi aboutir à l'identification de «Quantitative Trait Loci (QTL)» impliqués dans la variation de l'EUA et utilisables pour la sélection de variétés de colza présentant une meilleure gestion de l'azote endogène notamment en réponse à de faibles apports d'intrants azotés.

V.3.3.1 Vers d'autres voies d'amélioration de l'EUA du colza?

Si la sélection variétale constitue une des voies d'amélioration potentielle de l'EUA du colza, d'autres facteurs tels que la disponibilité en soufre (S) des sols, sont également à prendre en considération. En effet, le colza étant une culture particulièrement exigeante en S, il est actuellement acquis qu'une déficience en S peut diminuer significativement l'EUA (Fismes *et al.*, 2000) notamment en réduisant les capacités d'absorption et d'assimilation du nitrate (Kopriva et Rennenberg, 2004). Cependant, peu de travaux à ce jour se sont intéressés aux impacts d'une carence en S minéral (sulfate) sur les processus de sénescence foliaire et de mobilisation des composés N et de S endogènes.

Dans ce contexte, et face à la diminution de la disponibilité en S des sols liée à l'application d'un environnement réglementaire visant à diminuer les rejets soufrés d'origine industrielle, l'impact de la déficience en S sur la mobilisation des composés N (et S) chez le colza constitue un axe de recherche récemment initié au laboratoire dans le cadre du projet ANR COSMOS⁷ (implication personnelle à 40%). Les premières études réalisées dans le cadre de la thèse de L. Dubouset (adossée au projet ANR COSMOS et co-encadrée par le Pr. Avice JC et moi-même) avaient pour objectif d'évaluer l'impact d'une carence en S couplée (LN, LS) ou non (HN, LS) à une carence en N sur : la croissance végétative des plantes, la progression de la sénescence foliaire et les cinétiques de mobilisation des principaux composés azotés (protéines) et soufrés (sulfate) au sein des feuilles matures de colza. Ces résultats révèlent que comparativement aux plantes témoins correctement alimentées en N et S (HN, HS):

- Les plantes simplement carencées en S (HN, LS) ne présentent pas de différence significative des teneurs foliaires en chlorophylles ou de biomasse des parties aériennes. Par ailleurs, l'utilisation de l'indicateur moléculaire *SAG12/Cab* a permis de montrer que ces plantes présentaient un retard de progression de sénescence, particulièrement visible après 14 jours de carence en S (**figure 23A**). Le suivi des teneurs en sulfate au sein d'un rang foliaire mature carencé en S a permis de montrer que le sulfate était mobilisé préférentiellement dès le 7^{ème} jour de traitement *via* l'induction de transporteurs tonoplastiques, tels que *BnSultr 4;1* (et *4;2*), impliqués dans l'efflux du sulfate vacuolaire (**figure 23E**). En outre, la mobilisation des protéines foliaires (principalement composées de N et accessoirement de S) intervient entre 21 et 28 J, c'est-à-dire au moment où les stocks de sulfate foliaire sont au plus bas (**figures 23 C et D**). Cette mobilisation protéique tardive est en accord avec le ralentissement de la progression de sénescence et pourrait expliquer pour partie la faible EUA du colza observée lors d'une diminution des disponibilités en S minéral (Fismes *et al.*, 2000).

⁷ ANR COSMOS (n° JC05-51097) : Colza et Soufre : Mobilisation des composés soufrés et azotés en réponse à une Oligotrophisation en Soufre

- Les plantes soumises à une double carence N et S (LN, LS) présentent (i) une forte réduction des teneurs foliaires en chlorophylles, (ii) une réduction de biomasse aérienne (avec une croissance qui est toutefois maintenue) et (iii) une accélération de la progression de la sénescence foliaire semblable à celle observée généralement chez des plantes simplement carencées en N (figure 23A). Dans ce cas, et contrairement à ce qui a été observé chez les plantes simplement carencées en S, la mobilisation protéique est précoce (entre 7 et 14 J) et précède la mobilisation du sulfate vacuolaire et l'induction du transporteur de sulfate *BnSultr4;1* qui interviennent relativement tardivement (figures 23C, D et E). Cette mobilisation protéique relativement précoce est en accord avec l'accélération de la sénescence observée en réponse à la double carence S et N.

Ces résultats soulignent l'aptitude du colza au stade rosette, à maintenir sa croissance sur une longue durée de carence en S minéral (28 jours) grâce à des processus de recyclage interne du sulfate stocké préalablement au niveau vacuolaire *via* l'induction de transporteurs tonoplastiques. En outre, les processus de recyclage et la nature des composés mobilisés semblent dépendants du niveau de fertilisation azotée. Ainsi, les réponses contrastées des plantes à une carence en S en fonction de la disponibilité en N, suggèrent qu'il existe des mécanismes fins de co-régulations entre les métabolismes N et S.

Pour limiter les conséquences de la carence en S sur le rendement et la qualité grainière du colza, le CETIOM préconise l'utilisation de 75 kg de trioxyde de soufre (SO₃) par hectare. Toutefois, des résultats récents (thèse de L. Dubouset) montrent que les feuilles chutées issues de parcelles de colza fertilisées selon ces recommandations présentent des quantités résiduelles de sulfate élevées (environ ¼ de la quantité maximale). Ainsi, si cette dose de fertilisant semble correcte pour limiter les effets négatifs de la carence en S sur l'EUA du colza, celle-ci pourrait s'avérer trop élevée pour permettre une efficacité optimale d'utilisation du S (EUS). L'ensemble de ces données suggèrent qu'un ajustement des niveaux de fertilisation N et S minérale semble essentiel afin d'aboutir à la fois à une meilleure EUS et EUA du colza.

Actuellement, une enquête agricole conduite sur une cinquantaine de parcelles de colza du Calvados, avec prise en compte des pratiques culturales et notamment des doses d'intrants S et N utilisées, montre que les recommandations du CETIOM ne sont pas forcément suivies par les agriculteurs. A titre d'exemple, les premiers résultats de l'enquête révèlent que la fertilisation S apportée à la culture de colza varie de 0 à 80 kg de SO₃ par hectare. Le suivi du rendement grainier, de la qualité des graines et des teneurs en S et en N résiduels dans les feuilles chutées devraient permettre de révéler s'il existe (i) *in situ* des conditions de carence en S chez le colza et (ii) des conditions de fertilisation N et S croisées favorisant la mobilisation des composés N et S foliaires. Par ailleurs, d'autres études actuellement en cours dans le cadre des thèses L. Dubouset et de M. Abdallah ont pour objectifs de mieux comprendre la dynamique du soufre dans la plante (en réponse ou non à une carence en S) et de déterminer si la date d'apport du fertilisant S (au cours du cycle ontogénétique) peut avoir un impact sur les composantes du rendement et la mobilisation des composés N et S chez le colza.

L'ensemble de ces résultats devraient permettre de mieux évaluer l'impact d'une oligotrophisation en S sur la régulation des métabolismes S et N et à terme pourraient aboutir à proposer de nouvelles stratégies culturales visant à améliorer l'efficacité d'utilisation de ces deux éléments par la culture de colza.

Valorisation: Les principaux résultats exposés ci-dessus sont présentés dans la publication: [A.2].

Bibliographie:

Buchanan-Wollaston V., Ainsworth C. (1997) leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridization. *Plant Molecular Biology* 33: 821-834.

- Bevan M., Bancroft I., Bent E., Love K. Goodman H., Dean C., Bergkamp R., Dirkse W., Van Staveren M., Stiekema W.** (1998) Analysis of 19 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 391: 485-488.
- De Bellis L., Picciarelli P., Pistelli L., Alpi A.** (1990) Localization of glyoxylate-cycle marker enzyme in peroxisomes of senescent leaves and green cotyledons. *Planta* 180: 435-439.
- Declos M.** (2008) Modifications physiologique et protéomique associées à la remobilisation de l'azote foliaire au cours de la sénescence séquentielle chez le colza (*Brassica napus* L.). Thèse de Doctorat, spécialité Biologie Animale et Végétale, *Université de Caen*: 214 p.
- Desclos M., Dubousset L., Etienne P., Le Cahérec F., Satoh H., Bonnefoy J., Ourry A., Avice J.C.** (2008) A proteomic profiling approach to reveal a novel *Brassica napus* drought 22 kD/water-soluble chlorophyll binding protein in young leaves during nitrogen remobilization induced by stressful conditions. *Plant Physiology*, 147: 1830-1843.
- Desclos M., Etienne P., Coquet L., Cosette P., Bonnefoy J., Ségura R., Rezé S., Ourry A., Avice J.C.** (2009) A combined ¹⁵N tracing/proteomics study in *Brassica napus* reveals the chronology of proteomics events associated with remobilization during leaf senescence by nitrate limitation or starvation. *Proteomics*: in press.
- Dubousset L., Abdallah M., Desfeux A.S., Etienne P., Meuriot F., Hawkesford M.J., Gombert J., Ségura R., Bataillé M.P., Rezé S., Bonnefoy J., Ameline A.F. Ourry A., Le Dily F., Avice J.C.** (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*: in press.
- Etienne P., Desclos M., Le Gou L., Gombert J., Bonnefoy J., Maurel K., Le Dily F., Ourry A., Avice J.C.** (2007) N-protein mobilization associated to leaf senescence process of oilseed rape (*Brassica napus* L.) is concomitant with the disappearance of a trypsin inhibitor activity. *Functional Plant Biology*, 34: 895-906.
- Farmer E.E., Ryan C.A.** (1992) Octadecanoid precursor of jasmonic acid activates the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4: 129-134.
- Fismes J., Vong P.C., Guckert A., Frossard E.** (2000) Influence of sulfur on apparent N-use efficiency, yield and quality of oilseed rape (*Brassica napus* L.) grown on a calcareous soil. *European Journal of Agronomy* 12: 127-141.
- Gombert J., Etienne P., Ourry A., Le Dily F.** (2006) The expression pattern of the *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.
- Guo Y., Cai Z., Gan S.** (2004) Transcriptome of arabidopsis leaf senescence. *Plant Cell Environment* 27: 521-549.
- Horigome D., Satoh H., Itoh N., Mitsunaga K., Oonishi I., Nakagawa A., Uchida A.** (2007) Structural mechanism and photoprotective function of water-soluble Chlorophyll-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 6525-6531.
- Ilami G., Nespoulous C., Huet J.C., Vartanian N., Pernellet J.C.** (1997) Characterization of BnD22, a drought-induced protein expressed in *Brassica napus* leaves. *Phytochemistry* 45: 1-8.
- Kopriva S., Rennenberg H.** (2004) Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with C and N metabolism. *Journal of Experimental Botany* 55: 1831-1842
- Malagoli P., Lainé P., Rossato L., Ourry A.** (2005) Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to harvest. II: An ¹⁵N labeling-based simulation model of partitioning between vegetative and reproductive tissues. *Annals of botany* 95: 1187-1198
- Otegui M.S., Noh Y.S., Martinez D.E., Vila Petroff M.G., Staehelin A., Amasino R.M., Guimmet J.J.** (2005) Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of arabidopsis and soybean. *Plant Journal* 41: 831-844.
- Parrot D.I., Yang L., Shama L., Fischer A.M.** (2007) Senescence is accelerated, and several proteases are induced by carbon «feast» conditions in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Planta* 132: 67-80.
- Reviron M.P., Vartanian N., Sallantin M., Huet J.C., Pernellet J.C., De Vienne D.** (1992) Characterization of a novel protein induced by progressive or rapid drought and salinity in *Brassica napus* leaves. *Plant Physiology* 100: 1486-1493.
- Sanchez-Hernandez C., Martinez-Gallardo N., Guerrero-Rangel A., Valdes-Rodriguez S., Delano-Frier J.** (2004) Trypsin and alpha-amylase inhibitors are differentially induced in leaves of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) in response to biotic and abiotic stress. *Physiologia Plantarum* 122: 254-264.

- Schiltz S., Gallardo K., Huart M., Negroni L., Sommerer N., Burstin J.** (2004) Proteome reference maps of vegetative tissues in *Pisum sativum*: an investigation of nitrogen mobilization from leaves during seed filling. *Plant Physiology* 135: 2241-2260.
- Schjoerring J.K., Bock J.G.H., Gammelvind L., Jensen C.R., Mogensen V.O.** (1995) Nitrogen incorporation and remobilization in different shoot components of field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) as affected by rate of nitrogen application and irrigation. *Plant 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 chlorophyll derivatives. *Biochemistry* 42: 7427-7433.
- Sugarawa H., Shibuya K., Yoshioka T., Hashiba T., Satoh S.** (2002) Is a cysteine proteinase inhibitor involved in the regulation of petal wilting in senescing carnation (*Dianthus caryophyllus*) flowers. *Journal of Experimental botany* 53: 407-413.
- 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.
- Zimmerman P., Zentgraf U.** (2005) The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular and Molecular Biology Letters* 10: 515-535.

VI-PERSPECTIVES DE RECHERCHE

PERSPECTIVES DE RECHERCHE

L'évolution récente des contraintes économiques et environnementales liées à l'agriculture doit conduire rapidement à une amélioration de la gestion de l'N par les plantes de grande culture et en particulier du colza présentant un bilan agro-environnemental médiocre, conséquence directe de sa mauvaise efficacité d'utilisation de l'N (EUA). Dans ce contexte, l'amélioration et la sélection variétale sont actuellement les pistes les plus exploitées en vue d'obtenir des variétés à haut rendement en réponse à de faibles niveaux de fertilisation azotée. Toutefois, d'autres stratégies visant à stimuler le prélèvement d'azote minéral par les plantes et ainsi réduire les apports de fertilisants N, sont également en cours de développement. A terme, ces stratégies pourraient aboutir à la sélection de variétés plus efficaces vis-à-vis de l'azote et à la mise en place de nouvelles pratiques culturales (également applicables à ces nouvelles variétés) utilisant des doses réduites d'intrants azotés pour la fertilisation des plantes de grande culture.

Les perspectives que j'envisage de développer au sein de l'UMR EVA s'inscrivent dans ces différentes voies d'amélioration potentielles de la gestion de l'azote par le colza. Ainsi, une partie de mes perspectives consistera à développer une nouvelle thématique de recherche récemment initiée au laboratoire en collaboration avec le Pr A. Ourry et Ph. Laîné (UMR EVA) et dont l'un des objectifs vise à identifier des molécules d'origine biologique capables d'améliorer le prélèvement de l'N minéral et/ou l'EUA chez des plantes de grande culture telles que le colza et le blé (Programme AZOSTIMER, Axe I).

Un autre projet de recherche (Axe II, mis en place à partir de 2010) aura pour objectif d'approfondir nos connaissances sur le(s) rôle(s) fonctionnel(s) des protéines identifiées au cours de la thèse de M. Desclos (en particulier les anti-protéases et les protéases) afin de confirmer (ou d'infirmer) leur intervention dans la gestion de l'azote endogène chez le colza. La finalité de ces recherches vise à proposer des « protéines candidates » utilisables par les généticiens-améliorateurs pour la sélection de variétés de colza présentant une EUA optimisée.

PERSPECTIVES AXE I (2008-2011, confidentiel) :

VI.1 Vers de nouvelles molécules stimulant le prélèvement de l'azote : Programme AZOSTIMER

L'évolution des pratiques culturales constitue un impératif face aux pressions réglementaire et sociétale pour le développement d'une agriculture durable plus respectueuse de l'environnement. Ainsi, en utilisant des techniques de fertilisation innovantes, l'objectif principal du programme AZOSTIMER (développé dans le cadre du Pôle de compétitivité Mer Bretagne), vise à gagner des points d'efficacité nutritionnelle en limitant les pertes par voie gazeuse et en augmentant la part d'azote réellement utilisée par les plantes. Ce projet d'envergure associant des partenaires privés (Groupe TIMAC (St Malo), start-up Force-A (Orsay) et Anaximandre (Landerneau)) et public (UMR EVA (Caen), Ecole Nationale de Chimie (Rennes) et le Centre d'Investigation en Production Animale et Végétale (CIPAV, Pampelune, Espagne)), dispose d'un montant global de 3,3 millions d'euros (financement FUI et collectivités locales) dont 680 000 euros pour l'UMR EVA.

Dans ce programme, mes perspectives s'orienteront plus particulièrement **vers l'identification de molécules d'origine algale ou (humique) capables de stimuler le prélèvement de l'azote par le colza (et le blé)**. Une thèse (L. Jannin), placée sous mon co-encadrement à 50% (avec le Pr A. Ourry 50%) est d'ores et déjà engagée sur ce sous-projet depuis novembre 2008. Les travaux envisagés dans le cadre de cette thèse sont décrits ci-dessous et constituent le « Workpackage 1 (sur 2) » du projet AZOSTIMER.

VI.1.1 Criblage et identification des extraits d'algues (ou humiques)

Les extraits d'algues et les acides humiques sont respectivement fournis par le laboratoire BiotechMarine de Pontrieux et le CIPAV de Pampelune (Espagne). L'effet de l'apport racinaire de ces différents extraits sera évalué en réalisant des mesures non destructives telles que les cinétiques de croissance (biomasse totale des plantes), les vitesses d'absorption racinaire du nitrate et de l'ammonium ainsi que les analyses en temps réel des teneurs en chlorophylles. De plus, les teneurs foliaires en composés biochimiques tels que les polyphénols des feuilles seront déterminées en utilisant les outils de diagnostic récemment développés par le partenaire industriel Force-A. Par ailleurs, pour chaque conditions de culture, ces outils donneront accès un Indice appelé « Nitrogen Balance Index » (ratio Chlorophylles/Polyphénols) permettant d'estimer le contenu en azote des plantes. L'analyse de l'ensemble de ces traits permettra d'identifier les extraits d'algues (ou humiques) ayant un effet significatif sur la croissance et la nutrition azotée du colza.

Si aucun effet n'est observé sur l'ensemble des extraits testés, un criblage alternatif consistera à modifier (pour ces mêmes extraits) (i) les conditions de culture (variations de la nutrition minérale azotée), (ii) les conditions d'apport (apport foliaire et/ou modification des fréquences d'apports, (iii) les conditions de stress biotiques ou abiotiques (attaques pathogènes, stress hydrique) ou (iv) à cribler d'autres extraits fournis par le laboratoire BiotechMarine de Pontrieux.

VI.1.2 Optimisation des doses des extraits d'intérêt

En conditions hydroponiques, pour chaque extrait d'intérêt, des effets doses seront réalisés afin de déterminer les doses optimales à utiliser dans les futures expérimentations. Les analyses précédemment citées (§ VI.1.1a) seront également effectuées lors de ces expérimentations. Des échantillons foliaires et racinaires seront prélevés afin de réaliser des extractions d'ARN_{totaux} utilisables pour déterminer en Q-PCR, l'impact des différentes doses sur l'expression de gènes cibles comme par exemple ceux codants les transporteurs de nitrate *Bnrt 1.1* et *Bnrt 2.1*.

VI.1.3 Réponses physiologiques et moléculaires des plantes aux extraits d'intérêt

L'utilisation de puces transcriptomiques ciblées sur les principaux gènes intervenant dans les métabolismes azoté (N), carboné (C) et soufré (S) permettra de suivre, au niveau moléculaire, les effets de ces différents extraits et de mieux appréhender les principales modifications métaboliques de la plante. Ces analyses seront ensuite conduites à partir de plantes cultivées dans des conditions différentes afin de vérifier si certaines conditions environnementales sont susceptibles de potentialiser l'effet des extraits. Les gènes dont l'expression est modulée pourraient à terme être utilisés comme des indicateurs moléculaires pertinents pour le criblage d'autres extraits d'algues (ou humiques). En parallèle, la détermination des teneurs en N total ainsi qu'en protéines seront également effectuées afin de mieux appréhender l'effet des différents extraits sur le contenu en N endogène.

VI.1.4 Validation des extraits en conditions de plein champ

La phase ultime de ces expérimentations consistera à valider, en conditions de plein champ, les résultats précédemment obtenus. Des parcelles de colza implantées sur deux sites géographiquement différents (Haras du Pin (EVA) et Pampelune (CIPAV)) permettront d'évaluer l'impact agronomique des extraits en se basant sur des critères simples tel que le rendement machine ou l'EUA.

Les travaux conduits sur colza à l'UMR EVA sont également conduits sur blé au laboratoire CIPAV de Pampelune (Espagne). A terme, la mutualisation des résultats obtenus sur ces deux espèces végétales d'intérêt agronomique devraient conduire à l'identification de nouveaux composés d'origine biologique susceptibles de venir en substitution ou complément des engrais N actuellement utilisés en agriculture et ainsi permettre une diminution de leur dose.

PERSPECTIVES AXE II (à partir de 2010):

VI.2 Rôle(s) des inhibiteurs de protéases dans la régulation de la mobilisation de l'azote

Les travaux réalisés au cours de la thèse de M. Desclos ont révélés la présence en forte quantité d'un inhibiteur de protéases de type sérine (BnD22) dans des feuilles de colza présentant une vitesse de sénescence ralentie par rapport à des feuilles n'exprimant plus cette protéine. La présence de cet inhibiteur a également pu être corrélée à un maintien de teneurs foliaires en N, en protéines et en chlorophylles dans les feuilles, suggérant un rôle des inhibiteurs de protéases dans le maintien des fonctionnalités de la feuille. L'ensemble de ces travaux sont à rapprocher de ceux réalisés sur d'autres plantes évoquant l'intervention d'inhibiteurs de protéases à sérine et/ou à cystéine dans le contrôle de la protéolyse associée à la sénescence florale ou foliaire (Sugawara *et al.*, 2002 ; Shatters *et al.*, 2004, Sin et Chye, 2004). De plus, il n'est pas à exclure que ces inhibiteurs soient directement impliqués dans la régulation des mécanismes de mobilisation de l'N en modulant la date d'initiation de la sénescence foliaire.

Dans ce contexte, les perspectives que j'envisage de développer au sein de l'UMR EVA consisteront à réaliser des études fonctionnelles de la protéine BnD22 afin de mieux appréhender le niveau d'intervention de tels inhibiteurs de protéases dans la régulation des mécanismes de mobilisation de l'N associés à la sénescence foliaire chez le colza.

VI.2.1 Intervention d'inhibiteurs de protéases dans la protection de tissus foliaires?

Les travaux récemment réalisés au cours de la thèse de M. Desclos ont permis de mettre en évidence que certains inhibiteurs de protéases (BnD22) interviennent au cours des stades juvéniles de développement foliaire. En situation de contrainte azotée, l'accumulation de BnD22 dans les jeunes feuilles à pu être corrélée à une date d'entrée en sénescence foliaire plus tardive et un maintien des fonctionnalités de ces feuilles. Cependant, lors de ces études, l'analyse de l'expression de la protéine BnD22 a été conduite sur l'ensemble du limbe foliaire sans distinction entre les différents tissus qui constituent la feuille. Toutefois, lors de la sénescence foliaire, certains tissus vasculaires foliaires comme les nervures ou le pétiole, impliqués dans le transfert de produits de dégradation issus des autres tissus du limbe, voient leur intégrité et leur fonctionnalité maintenues jusqu'à des stades tardifs de développement de la feuille. ***Face à ce constat, l'hypothèse de l'intervention de BnD22 dans la protection de ces tissus au cours de la sénescence foliaire jusqu'à des stades tardifs de sénescence foliaire peut être émise.***

Afin de vérifier cette hypothèse, j'envisage de réaliser une étude cinétique de l'expression tissulaire de la protéine BnD22 à partir d'un rang foliaire de colza cultivé au stade rosette et dont l'état de sénescence sera déterminé grâce à l'indicateur moléculaire *SAG12/Cab*. Cette étude sera conduite aux niveaux transcriptomique et protéomique (1-DE, 2-DE et zymogrammes) sur la durée de vie complète de la feuille, c'est-à-dire de son émergence jusqu'à sa chute et pourra éventuellement être complétée par une étude similaire réalisée sur le même rang foliaire provenant de plantes carencées en azote (conditions d'induction de BnD22). Parallèlement, des localisations tissulaires (nervures, pétioles et reste du limbe) de la protéine BnD22 seront également envisagées en utilisant soit des techniques d'hybridations *in situ*, soit des techniques de microscopies confocales qui font actuellement l'objet de mises au point au laboratoire par J. Trouverie et J.C. Avicé.

Ce type d'approche devrait permettre de mieux appréhender l'implication potentielle de BnD22 dans la protection de certains tissus au cours de la sénescence foliaire.

Toutefois, si la protéine BnD22 ne s'avérait pas être un déterminant majeur dans le maintien de la fonctionnalité de ces tissus, l'approche protéomique (par zymogrammes et 2-DE) pourraient conduire à

l'identification d'autres inhibiteurs de protéases et/ou à d'autres protéines intervenant dans ces processus de protection.

VI.2.1 Intervention des inhibiteurs de protéases au stade reproducteur?

Les travaux conduits jusqu'à ce jour font état d'une expression de BnD22 au niveau des jeunes feuilles issues de plantes au stade rosette, stade au cours duquel il est actuellement admis que la mobilisation d'N foliaire n'est pas optimale comparée à celle qui se produit au stade reproducteur (Malagoli *et al.*, 2005). Par conséquent, il semble particulièrement intéressant d'étudier l'expression foliaire de BnD22 dans des feuilles issues de plante au stade reproducteur, caractérisées par de faibles teneurs en azote résiduel au moment de leur abscission. Ainsi, deux hypothèses contradictoires pourraient expliquer ces faibles teneurs en azote :

- ***une forte quantité de protéines BnD22 dans ces feuilles (ou d'autres inhibiteurs de protéases) induit un retard de sénescence permettant ainsi une meilleure synchronisation entre la mobilisation de l'N endogène et le remplissage des graines en N. Ce retard de sénescence se traduit globalement par une durée de mobilisation plus longue permettant un vidage de l'N endogène plus efficace.***
- ***une faible quantité de protéine BnD22 dans ces feuilles (ou d'autres inhibiteurs de protéases) provoquent une sénescence prématurée. Cette accélération de la sénescence s'accompagnerait par exemple d'une durée de mobilisation plus longue des composés difficilement mobilisables (comme ce qui a pu être observé lors de la carence en N) à l'origine d'un meilleur vidage en N des feuilles.***

Afin de vérifier l'une ou l'autre de ces hypothèses, une étude cinétique de l'expression foliaire de BnD22 sera conduite à partir d'un rang foliaire (suivi de son émergence jusqu'à sa chute) issu de plants de colza au stade reproducteur. Cette étude cinétique sera complétée par la détermination de la date théorique d'entrée en sénescence (*SAG12/Cab*) et par le suivi de certains paramètres biochimiques (tels que les teneurs en protéines et en azote foliaires) afin d'établir avec précision la durée de chacune des phases de sénescence précédemment caractérisées par M. Desclos (2008).

Parallèlement à cette étude, les compartiments racinaires et caulinaires seront analysés pour rechercher la présence éventuelle de la protéine BnD22 au sein de ces tissus afin de déterminer si :

-au niveau caulinaire : la présence d'inhibiteurs de protéases pourrait pour partie expliquer le maintien de la fonctionnalité des tissus vasculaires jusqu'à des stades très tardifs de la sénescence monocarpique.

-au niveau racinaire : la présence d'une forte activité inhibitrice de protéase précédemment identifiée dans le pivot de colza par Beuve (2005) peut-être imputée ou non à la protéine BnD22. Si tel n'était pas le cas, les approches utilisées (2-DE couplée aux zymogrammes 2D, pourraient conduire à l'identification d'un nouvel inhibiteur de protéases chez le colza. De plus, cette étude cinétique de l'expression de cette protéine couplée à un marquage ¹⁵N pourrait permettre de vérifier si l'accumulation racinaire de cet inhibiteur coïncide avec la mise en réserve transitoire d'N précédemment mise en évidence au cours des stades précoces du développement reproducteur (Rossato *et al.*, 2002). Le cas échéant, ces résultats permettraient de mieux comprendre l'intérêt physiologique de la forte accumulation ces inhibiteurs de protéases au niveau racinaire.

Ces différentes études devraient permettre de mieux appréhender la régulation tissulaire de BnD22 au cours de la sénescence séquentielle (stade végétatif) ou monocarpique (stade reproducteur) ainsi que son implication potentielle dans le maintien de la fonctionnalité de certains tissus au cours de ce processus. Toutefois, ces expériences étant très peu informatives sur la fonction et les cibles de cet inhibiteur de protéases, une autre partie de mes perspectives s'attachera à réaliser une étude fonctionnelle de la protéine BnD22.

VI.2.2 Etude fonctionnelle de l'inhibiteur de protéase BnD22

Si les études précédentes ont pour objectif d'étudier l'expression tissulaire de BnD22 au cours de la sénescence foliaire, elles permettent (*en sus* des résultats obtenus par Desclos, 2008) également d'émettre un certain nombre d'hypothèses quant au rôle fonctionnel de cet inhibiteur de protéases dans la régulation des processus de mobilisation de l'N foliaire chez le colza. Toutefois, seule une étude fonctionnelle de cette protéine permettra de confirmer ou d'infirmer ces différentes hypothèses. C'est pourquoi, dans la dernière partie de mes perspectives, j'envisage de réaliser cette étude fonctionnelle en développant différentes approches:

- **La génétique inverse** : (collaboration à envisager avec l'UMR 188 APBV de Rennes et l'INRA d'Evry). Le criblage de la banque de mutants EMS de *Brassica napus* par « Targetting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) » pourrait permettre d'identifier des géotypes présentant un défaut d'expression du gène (et de la protéine) BnD22. La caractérisation de ces mutants aux niveaux phénotypiques, physiologiques et moléculaires apportera des informations de choix quant au niveau d'intervention de BnD22 dans les processus de mobilisation de l'N associés à la sénescence foliaire. De plus, une étude de la sénescence d'un rang foliaire issu de ces mutants sera conduite en utilisant des approches semblables à celles utilisées lors de la thèse de M. Desclos dans le but de déterminer l'impact d'un défaut d'expression du gène *BnD22* sur l'initiation et l'amplitude des différentes phases (1 et 2) de la sénescence foliaire. Enfin, les différentes hypothèses émises précédemment, et notamment celles concernant le(s) rôle(s) potentiel(s) de cet inhibiteur dans la protection de certains tissus et dans le vidage foliaire optimal au stade reproducteur pourront également être vérifiées chez ces mutants « BnD22 déficients ».

Alternative: Dans le cas où le criblage de mutant s'avèrerait infructueux, une autre approche consisterait à générer des colzas transgéniques sous-exprimant le gène BnD22 via la stratégie d'ARN interférence en collaboration avec l'INRA de Versailles ou de Rennes.

- **La variabilité génotypique**: l'étude de l'expression de *BnD22* pourrait également être conduite chez des lignées de colza présentant des efficacités d'utilisation de l'azote (EUA) contrastées afin de montrer une éventuelle corrélation entre le niveau d'accumulation de cette protéine et l'EUA chez ces variétés. De telles variétés sont actuellement en cours de criblage dans le cadre des programmes de recherche Genoplante ARCOLE⁸ et GERNERGY⁹ auxquels le laboratoire participe activement sous l'impulsion des Professeurs F. Le Dily et J.C. Avise. Les premiers résultats issus de ces programmes permettent d'être optimiste quant à la disponibilité prochaine de lignées de colza présentant des EUA contrastées notamment en situation de faible apport d'intrants azotés. Le gène BnD22 fait d'ailleurs partie d'une liste de gènes cibles dont l'expression est actuellement suivie au sein de ces différentes lignées.

Cette stratégie permettra d'établir si les variations génotypiques d'expression de l'inhibiteur de protéase BnD22 peuvent être mises en relation avec les variations l'EUA ou encore la faible teneur en N des feuilles chutées.

VI.2.2 Conclusions

Les résultats qui émaneront de ces recherches permettront de confirmer si l'inhibiteur de protéases BnD22 peut être considéré comme une protéine jouant un rôle déterminant dans la régulation des processus de mobilisation de l'N conditionnant l'EUA du colza. Le cas échéant, des perspectives plus élargies de ces travaux pourraient consister à cartographier le gène codant la protéine BnD22 afin d'aboutir à l'identification de «Quantitative Trait Loci (QTL)» impliqués dans la variation de l'EUA ou la teneur en N résiduel des feuilles chutées. Enfin, si le rôle de BnD22 est avéré,

⁸ ARCOLE : Efficience de la nutrition azotée du colza de printemps : identification de cibles de sélection (N° ANR_05GNPA_032)

⁹ GERNERGY : Improvement of the oil yield of the rapeseed crop in the context of the biofuel production (N° ANRGPLO7)

d'autres pistes de recherche consisteront à rechercher les protéines cibles de cet inhibiteur en utilisant par exemple une stratégie «double hybride». Ces approches pourraient permettre (i) d'identifier des systèmes protéolytiques impliqués dans les processus de mobilisation de l'azote et (ii) d'identifier de nouvelles «protéines candidates (protéases)» potentiellement utilisables pour la sélection variétale.

Le programme de recherche proposé dans l'axe 2 de mes perspectives, devrait permettre d'élargir nos connaissances fondamentales concernant la régulation et le(s) rôle(s) des inhibiteurs de protéases chez le colza. De plus, les données acquises lors de ces travaux pourraient également avoir des retombées agronomiques permettant d'aboutir à la sélection de nouvelles variétés de colza présentant une EUA optimisée. Ce programme de recherche fera l'objet d'une demande de bourse doctorale au cours de l'année 2010.

Collaborations envisagées (ou déjà engagées*) :

Axe I (toutes les collaborations sont déjà engagées):

- UMR CNRS 6522, Polymères, Biopolymères, Membranes, Rouen*.
- UMR CNRS 6510, Synthèse et Electro synthèse Organiques, Ecole Nationale de Chimie de Rennes*.
- Société TIMAC Agro-Fourniture Internationale, Saint Malo*.
- Société Force-A, Université Paris XI, Orsay*.
- Centre d'Investigation en Production Animale et Végétale (CIPAV), Université de Navarre, Espagne*.
- Société IMAXIO, Clermont-Ferrand.

Axe II:

- UR 511 Nutrition Azotée des Plantes, INRA de Versailles.
- UMR INRA-Agro-Campus 118, Amélioration des Plantes et Biotechnologies Végétales, Rennes I.
- UMR INRA 1165-CNRS 8114, Unité de recherche en génomique Végétale, Evry.

Bibliographie:

- Beuve F.X** (2005) Rôle des VSP dans le stockage de l'azote issu du recyclage afin d'améliorer l'efficacité d'utilisation de l'azote chez les plantes. Master2 S.T.S, Spécialité Génétique, adaptations et productions végétales, *Université de Rennes I*: 26 p.
- Declos M.** (2008) Modifications physiologique et protéomique associées à la remobilisation de l'azote foliaire au cours de la sénescence séquentielle chez le colza (*Brassica napus* L.). Thèse de Doctorat, spécialité Biologie Animale et Végétale, *Université de Caen*: 214 p.
- Malagoli P., Laîné P., Rossato L., Ourry A.** (2005) Dynamic of nitrogen uptake and mobilization in field grown oilseed rape from stem expansion to harvest. I Global N flows between vegetative and reproductive tissues in relation with leaf fall and their residual N. *Annals of Botany* 95: 853-861.
- Shatters R.G., Bausher M.G., Hunter W.B., Chaparro J.X., Dang P.M., Niedz R.P., Mayer R.T., McCollum T.G., Sinisterra X.** (2004) Putative protease inhibitor gene discovery and transcript profiling during fruit development and leaf damage in grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.). *Gene* 326: 77-86
- Sin S.F., Chye M.L.** (2004) Expression of proteinase inhibitor II proteins during floral development in *Solanum americanum*. *Planta* 219: 143:153.
- Sugawara H., Shibuya K., Yoshioka T., Hashiba T., Satoh S.** (2002) Is a cysteine proteinase inhibitor involved in the regulation of petal wilting in senescing carnation (*Danthus caryophyllus* L.) flowers? *Journal of Experimental Botany* 53: 407-413.
- Rossato L., Le Dantec C., Laîné P., Ourry A.** (2002) Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the cycle: identification, characterization and immunolocalization of a putative taproot storage glycoprotein. *Journal of Experimental Botany* 53: 265-275.

[Science sans conscience n'est que ruine de l'âme, Rabelais, 1532]

VII-PUBLICATIONS