

**Université de Caen Basse-Normandie**

Ecole doctorale Biologie Intégrative, Santé et Environnement

**Thèse de doctorat**

présentée et soutenue le 9 décembre 2014

par

***Vincent Billard***

pour obtenir le

**Doctorat de l'Université de Caen Basse-Normandie**

**Spécialité : Biologie animale et végétale**

**Biofortification des plantes en Fe, Mg, Cu et Zn : Etudes de l'effet de biostimulants sur leur absorption et caractérisation de leur remobilisation foliaire en condition de carence chez *Brassica napus*.**

Directeur de thèse : *Philippe Etienne*

Co-directeur de thèse : *Alain Ourry*

**Jury**

Mme Céline Masclaux-Daubresse, Directrice de Recherche, INRA, Versailles (Rapporteur)

M Christian Hermans, Chercheur Associé, F.R.S.- FNRS, Bruxelles, Belgique (Rapporteur)

Mme Agnès Piquet-Pissaloux, Professeur, VetAgro Sup, Lempdes (Examinateur)

M Alain Bouchereau, Professeur, Université de Rennes 1, Rennes (Examinateur)

M Jean-Claude Yvin, Directeur de Recherche R&D, C.R.I.A.S, Dinard (Examinateur)

M Philippe Etienne, Maître de Conférences, HDR, UCBN, Caen (Directeur de thèse)

M Alain Ourry, Professeur, UCBN, Caen (Co-directeur de thèse)



## REMERCIEMENTS

---

J'adresse tout d'abord mes remerciements à Timac Agro International et à la Région Basse-Normandie pour leur soutien financier qui m'a permis de réaliser cette thèse.

Je remercie Marie-Pascale Prud'homme, directrice du laboratoire EVA, et Philippe Laîné, directeur adjoint, pour m'avoir accueilli au sein de ce laboratoire et m'avoir permis de réaliser ces travaux dans un environnement scientifique idéal.

Je suis reconnaissant envers Mme Céline Masclaux-Daubresse et M. Christian Hermans pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit de thèse. J'adresse également mes remerciements à M. Alain Bouchereau et Mme Agnès Piquet-Pissaloux pour prendre part à ce jury.

Je remercie M. Jean-Claude Yvin pour ses avis et ses recommandations tout au long de l'avancement de ces travaux, et surtout pour son soutien lorsqu'il a fallu rebattre les cartes, ainsi que pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je ne peux qu'être reconnaissant à Philippe Etienne et Alain Ourry. Merci à tous les deux pour tout ce que vous m'avez apporté. Merci de m'avoir fait confiance lors du recrutement, de m'avoir poussé lors des moments de faiblesse, de m'avoir soutenu lors de la réorientation drastique du sujet. J'ai apprécié chacun de vos conseils éclairés et chacune de vos corrections toujours justifiées. Je crois que je n'aurais pas pu avoir de meilleur encadrement que celui que vous m'avez donné. Une de mes rares critiques serait que vous hésitez toujours sur mon véritable nom.

Je remercie également tout le labo EVA, avec par ordre alphabétique : Anne-Françoise pour les cultures, les mots croisés et les quiches ; Annette pour me faire comprendre « R » ; Jacques pour ses conseils en bioinfo ; JB pour les ateliers ; JC pour m'avoir accompagné lors de la protéomique ; Josette pour les échantillons ICP-MS et les récoltes ; Julie pour la BM et les récoltes ; Marie-Paule pour les analyses ICP-MS ; Magali et Josiane pour faire en sorte qu'on ne manque de rien, ainsi que pour votre aide pour les récoltes ; Marie-Pascale pour sa disponibilité ; Patrick pour l'informatique ; Philippe L pour régler les problèmes financiers ; Servane pour les stats ; Sophie BM pour m'avoir aidé lorsqu'un éditeur a jugé bon de me demander d'évaluer un article, ainsi que pour tous les potins de midi ; Sophie V pour l'administratif ; et tous ceux que je n'ai pas cités, pour les discussions que nous avons pu avoir au RU, autour des traditionnels mots fléchés, et pour les séminaires du jeudi.

Je vous laisse un logo, prenez-en soin !





Je terminerai la liste de remerciement à destination du labo par une (trop) courte attention à mes collègues doctorants. Merci à Laetitia pour m'avoir confié la suite de tes travaux, Mustapha pour tes conseils avisés. Philippe, je garderai toujours en mémoire les bons moments passés aux carnivals ou autour d'une bière maison. Et bien sûr, comment ne pas remercier toutes les doctorantes, avec qui j'ai alterné les moments studieux et ceux de décompressions, tous deux indispensables ! Alex et Caro avec qui j'ai tant partagé (dont un bureau) pendant ces 3 années. Je vous attends de l'autre côté ! De même pour les Sérapiettes, Elise, Anne et Thaïs, bien que vous soyez exilées à l'autre bout du labo. J'adresse une mention spéciale à Anne, avec qui j'ai partagé les manips, les données et les prises de tête sur les tableaux Excel. Je remercie l'ex-« pauvre M2 » Marine, pour sa bonne humeur pétillante. Je souhaite beaucoup de courage à Elise, la nouvelle pensionnaire du bureau des doctorants.

Je remercie tous ceux de Timac, qu'ils soient bretons du CRIAS ou espagnols du CIPAV, pour vos conseils et vos avis lors de nos entretiens, ainsi que pour votre aide technique dans les dosages de cations et de minéraux. J'ai particulièrement apprécié votre efficacité et votre rapidité quand cela s'avérait nécessaire.

J'exprime mes remerciements à Thierry Jouenne et Laurent Coquet, de la plateforme PISSARO, qui ont su répondre à mes demandes et mes interrogations lors de l'identification protéomique. Merci également à Didier Goux et Nicolas Elie du CMABIO ainsi qu'à Gilbert Pigree et Maxime Lemarchand d'IMOGERE.

Merci à l'EdNBISE, pour l'encadrement, les formations de qualité proposées au cours de ces trois années, ainsi pour l'aide financière me permettant de présenter mes travaux à un congrès international.

Ce manuscrit est l'aboutissement de plus de 25 années dans le système de l'enseignement français. Je tiens à remercier certains profs qui ont jalonné mon parcours et m'ont inculqué leur savoir : M. Denoux qui a fait aimer la bio à toute une classe de seconde ; MM Guichard et Vallin, dont la pédagogie m'a permis d'avoir une note inespérée à mon premier diplôme de l'enseignement supérieur ; M. Parent qui m'a fait découvrir et aimer la génétique malgré ma prestation calamiteuse en PCEM1 ; Mme Charles, qui m'a poussé à postuler au Master Européen de Génétique ; M. Silbert pour tout son temps consacré à la qualité du Master. J'ai une pensée toute particulière pour mes maîtres de stage Mme Timmermans et M. Frugier. Maja, je te remercie de m'avoir accueilli dans ton labo de Cold Spring Harbor et de m'avoir permis de me confronter au monde de la recherche. Ce stage a été pour moi d'une importance considérable, tant du point de vue culturel, linguistique que professionnel. Florian, travailler avec toi a été un tel plaisir que je m'en voudrais toujours un peu de ne pas avoir pu travailler 3 ans de plus dans ton labo. Je remercie Pascal Favrel et l'Université de Caen Basse-Normandie pour m'avoir permis de passer de l'autre côté. Après toutes ces années passées à recevoir un enseignement, j'ai vraiment apprécié en donner. Je tiens particulièrement à



remercier Isabelle Mussio et Juliette Fauchot qui m'ont encadré dans cette tâche. Merci à mes étudiants de L1 qui n'ont pas rendu ce travail trop épuisant.

Merci à Sophie, pour avoir contribué à ce travail lors de son stage de BTS et que j'ai eu le plaisir d'encadrer.

Rien n'aurait été possible sans le soutien indéfectible de mes parents, qui m'ont accompagné financièrement et moralement quels que soient mes choix d'orientation. Merci à Flo, d'avoir choisi une autre orientation qui me fait passer pour l'illuminé de la famille. Je termine ces 8 années de biologie alors que ma sœur commence tout juste son cursus. Schtroumpfette, je te souhaite autant de plaisir au pays des animaux, des plantes et de l'ADN que j'en ai eu.

Merci à Marie, qui m'a précédé sur la voie MEG-CSHL-ISV, et m'a permis de m'aiguiller. Merci à mes amis, Denis, Marco, Manu, Ben, Pierrot, pour qui je n'ai pas été suffisamment disponible au cours de ces 3 années.

Princesse, à toi revient l'honneur de clore ces remerciements. Il serait trop long d'énoncer ici tout ce que je te dois. Alors simplement : merci pour tout, et surtout d'avoir supporté l'éloignement.



## LISTE DES ABBREVIATIONS

---

### **3**

---

3PGDH : 3-PhosphoGlycerate  
DeHydrogenase

### **C**

---

COPT : Copper Transporter

### **D**

---

DW : Dry Weight  
DHAP : Dihydroxy Acetone  
Phosphate

### **F**

---

F1-6BP : Fructose-1,6-Bis-Phosphate,  
FAO : Food and Agriculture  
Organization.  
FBPase : Fructose 1-6 BisPhosphatase

### **G**

---

GAP : GlycerAldehyde-3-Phosphate  
GAPDH : GlycerAldehyde-3-  
Phosphate DeHydrogenase  
GCC : Glycine Cleavage Complex  
GCSH : Glycine Cleavage System H  
GSA : Glutamate-1-Semialdehyde  
2,1-Aminomutase

### **H**

---

HMA : Heavy Metal Associated  
HSC70 : Heat Shock Cognate 70kDa

### **I**

---

ICP-OES : Inductively Coupled  
Plasma-Optical Emission  
Spectrometry  
IDH : Isocitrate DH  
IREG : Iron Regulated  
IRMS : Isotope Ratio Mass  
Spectrometer  
IRT1 : IronRegulated Transporter

### **M**

---

MF: Masse fraiche  
MGT : Magnesium Transporter  
MoCo : Molybdenum cofactor  
MS: Masse sèche  
MTP : Metal Tolerance Protein

### **N**

---

NA: Nicotianamine  
NCED4 : Nine Cis Epoxy-caroyenoid  
Dehydrogenase 4  
NRAMP : Natural Resistance-  
Associated Macrophage Protein



---

## O

OEE : Oxygen Evolving Enhancer  
OGM : Organisme Génétiquement  
Modifié

---

## P

PDH : Pyruvate Dehydrogenase  
PDI : Protein disulfide Isomerase  
PFK : PhosphoFructoKinase  
PGK : PhosphoGlucoKinase  
PGM : PhosphoGlucoMutase  
PK : Pyruvate Kinase  
PS : Phytosédérophore  
PSI : PhotoSystem I  
PSII : Photosysteme II

---

## Q

Q-PCR : Quantitative Polymerase  
Chain Reaction.

---

## R

R5P : Ribulose-5-Phosphate  
RT : Reverse Transcription  
RuBisCO : Ribulose-1,5-  
BISphosphate  
Carboxylase/Oxygenase

---

## S

SOD : Superoxyde Dismutase

---

## T

TPI : Triose Phosphate Isomerase

---

## V

VAR3 : Variegata 3

---

## W

WHO : World Health Association  
(OMS)  
WOSR : Winter Oil Seed Rape

---

## X

X5P : Xylose-5-Phosphate

---

## Y

YS-YSL : Yellow Strip-Yellow Strip-  
like

---

## Z

ZIP : Zinc Iron regulated transport  
Protein





## Table des matières

REMERCIEMENTS.....	ii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	v
PREFACE.....	1
CHAPITRE 1 : Analyse bibliographique.....	4
1. La production agricole mondiale face aux besoins alimentaires humains.....	4
1.1 Augmenter la production agricole pour répondre à l'accroissement démographique.....	4
1.2 L'augmentation du rendement des produits récoltés ne s'accompagne pas toujours d'un maintien de la qualité.....	5
1.3 Origine de la perte de qualité.....	6
1.4 La « faim cachée », un paradoxe alimentaire ?.....	7
2. Fer, magnésium, cuivre et zinc : des éléments essentiels à la santé humaine.....	7
2.1 Le Fer (Fe).....	7
2.2 Le Magnésium (Mg).....	8
2.3 Zinc (Zn).....	8
2.4 Cuivre (Cu).....	9
3. Comment améliorer la teneur en Zn, Cu, Mg et Fe des tissus végétaux récoltés.....	10
3.1 Par biofortification.....	10
3.1.1 Principes.....	10
3.1.2 Les méthodes de biofortification.....	11
3.2 Identification de biostimulants efficaces.....	20
3.3 Les micronutriments cibles de la biofortification : rôles et transport chez les végétaux.....	21
3.3.1 Le Fer (Fe).....	21
3.3.2 Le magnésium (Mg).....	24
3.3.3 Le Zinc (Zn).....	26
3.3.4 Le Cuivre (Cu).....	28
3.3.5 Interactions éléments-éléments.....	29
4. Objectifs de recherche.....	31
CHAPITRE 2 : Deux biostimulants dérivant d'algues et d'acide humique induisent une réponse similaire du contenu minéral et de l'expression de gènes chez le colza ( <i>Brassica napus</i> L.).....	34
Avant-propos.....	34
Keywords.....	35
Abstract.....	36
Abbreviations.....	36
1. Introduction.....	37



2.	Material and methods.....	39
2.1	Growth conditions.....	39
2.2	Extraction and composition of <i>Ascophyllum nodosum</i> extract AZAL5.....	39
2.3	Method of preparation of the humic acid sample, HA7.....	40
2.4	Plant treatment.....	40
2.5	Fluorescence confocal microscopy.....	41
2.6	Analysis of nutrients in plant tissues and extracts.....	41
2.7	RNA extraction.....	41
2.8	Reverse transcription and Q-PCR analysis.....	42
2.9	Data and statistical analysis.....	43
3.	Results.....	43
3.1	AZAL5 and HA7 increased biomass and chloroplast number.....	43
3.2	Mineral concentrations and amounts per plant.....	44
3.3	Mineral composition of AZAL5 and HA7 extracts.....	45
3.4	Differentially expressed genes in response to AZAL5 and HA7 treatments.....	46
4.	Discussion.....	48
5.	Conclusion.....	50
CHAPITRE 3 : Une déficience en cuivre chez <i>Brassica napus</i> induit une remobilisation du cuivre, une accumulation du molybdène et des modifications de l'expression de protéines plastidiales.....		51
Avant-propos.....		51
Keywords.....		52
Abstract.....		53
Abbreviations.....		53
1.	Introduction.....	54
2.	Material and methods.....	56
2.1	Growth conditions.....	56
2.2	Analysis of nutrients in plant tissues.....	57
2.3	RNA extraction.....	58
2.4	Reverse transcription (RT) and Q-PCR analysis.....	58
2.5	Extraction and determination of total proteins.....	59
2.6	Two-dimensional electrophoresis (2-DE) and image analysis.....	60
2.7	RuBisCO relative quantification.....	60
2.8	Protein Identification by ESI LC-MS/MS.....	61
2.9	Data and statistical analysis.....	61
3.	Results.....	62
3.1	Cu depletion affects the growth and Cu content of <i>B. napus</i> .....	62



3.2	Cu depletion increases expression of Cu transporters in <i>Brassica napus</i> .....	63
3.3	Cu depletion affects uptake of some mineral nutrients .....	63
3.4	Cu depletion induces proteomic modifications .....	63
4.	Discussion .....	64
4.1	Cu remobilization from old leaves is induced by Cu deficiency .....	64
4.2	Effect of Cu deficiency on metabolic pathway in chloroplasts from old leaves of <i>B. napus</i> .....	65
4.3	Crosstalk between Cu, [Fe-S] and Mo .....	67
CHAPITRE 4 : La remobilisation du Mg induite par une privation en Mg est indépendante de la sénescence chez <i>Brassica napus</i> .....		69
Avant-propos .....		69
Keywords .....		70
Abstract .....		71
Abbreviations .....		71
1.	Introduction .....	72
2.	Material and methods .....	74
2.1	Growth conditions .....	74
2.2	Analysis of nutrients in plant tissues .....	75
2.3	RNA extraction .....	76
2.4	Reverse transcription (RT) and Q-PCR analysis .....	76
2.5	Extraction and determination of total proteins .....	77
3.	Two-dimensional electrophoresis (2-DE) and image analysis .....	78
3.1	Protein Identification by ESI LC-MS/MS .....	79
3.2	RuBisCO relative quantification .....	79
3.3	Data and statistical analysis .....	80
4.	Results .....	80
4.1	Mg-depletion reduces growth and Mg contents of <i>B. napus</i> .....	80
4.2	Mg-depletion increased uptake of Mn and Zn independently of growth .....	81
4.3	Effects of Mg deprivation on root transporter transcript levels. ....	82
4.4	Senescence of old leaves is not induced by Mg depletion. ....	82
4.5	Mg depletion induces proteomic modifications .....	82
5.	Discussion .....	83
CHAPITRE 5 : Une déficience en Zn induit une accumulation de Mo et de Mn et des modifications du protéome foliaire chez <i>Brassica napus</i> .....		87
Avant-propos .....		87
Keywords .....		88
Abstract .....		89



Abbreviations.....	89
1. Introduction.....	90
2. Material and methods.....	92
2.1 Growth conditions.....	92
2.2 Analysis of nutrients in plant tissues.....	92
2.3 Analysis of proteome.....	93
2.4 Data and statistical analysis.....	93
3. Results and discussion.....	94
3.1 Zn is not remobilized during Zn depletion in <i>B. napus</i> .....	94
3.2 Zn-depletion increased the uptake of Mn and Mo.....	95
3.3 Zn depletion induces proteomic modifications.....	95
CHAPITRE 6 : Discussion générale.....	98
1. AZAL5 et AH7, deux biostimulants efficaces sur l'absorption et la translocation de certains nutriments.....	99
2. En situation de carence, le colza mobilise le Cu et le Mg mais pas le Zn.....	101
3. La remobilisation du Cu et du Mg est probablement indépendante de la sénescence.....	104
4. Chez le colza, les carences en Cu, Mg et Zn induisent des modifications de l'absorption de nombreux éléments et du protéome foliaire.....	106
4.1 Modifications de l'absorption des nutriments lors de carences en Zn, Mg et Cu.....	106
4.2 Modifications du protéome des feuilles âgées des plantes carencées.....	108
CHAPITRE 7 : Perspectives.....	110
Bibliographie.....	115





## PREFACE

---

Afin de répondre au mieux aux enjeux économiques et écologiques actuels, la gestion des nutriments par les plantes constitue un critère largement pris en compte dans les programmes de recherche visant à maintenir, voire améliorer, le rendement des plantes de grande culture tout en réduisant les doses d'intrants, notamment azotés. Dans ce contexte, le projet AZOSTIMER (2008-2011), réalisé en partenariat entre des entreprises privées telles que Timac Agro International, Force A et Anaximandre, et des laboratoires académiques tels que les laboratoires de « Chimie organique et supramoléculaire » et « Chimie et ingénierie des procédés » de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, et l'UMR INRA/Université de Caen Basse Normandie « Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutrition N, C, S » (UMR INRA/UCBN EVA), avait notamment pour objectif de caractériser des fertilisants éco-innovants (à base d'algues et d'acides humiques) capable d'améliorer la croissance et la nutrition azotée et soufrée des végétaux et plus particulièrement, du colza et du blé.

A l'issue de ce projet, les travaux de L. Jannin ont permis d'identifier et de caractériser deux biostimulants, un extrait algal (AZAL5) et un extrait dérivé d'un acide humique (HA7), ayant un effet bénéfique sur la croissance, la division des chloroplastes et la régulation des métabolismes N et S du colza. Toutefois, au cours de ces travaux, l'impact de ces extraits sur la nutrition minérale du colza au sens large, c'est-à-dire sur l'absorption, la mise en réserve et la remobilisation des micronutriments essentiels à la croissance du végétale, n'a pas été abordée.

Or, il a été constaté que la teneur en micronutriments (notamment Cu, Zn, Mg et Fe) dans les tissus végétaux récoltés diminuait depuis les années 1960, période qui coïncide avec l'arrivée de cultivars à haut rendement issus de la Révolution Verte. Quelques études ont ainsi permis de montrer que cette chute de teneur en micronutriments, inversement proportionnelle au rendement, n'était pas due à une diminution des ressources en minéraux au niveau du sol, mais trouverait son origine dans la sélection variétale opérée principalement sur des critères d'augmentation de rendements. Outre le fait que la diminution de la teneur en certains micronutriments peut avoir des conséquences sur la physiologie de la



plante, la perte de qualité des produits récoltés peut également avoir de graves répercussions sur la santé des populations humaines en accroissant la prévalence des carences nutritionnelles et en particulier en micronutriments malgré une alimentation apparemment saine.

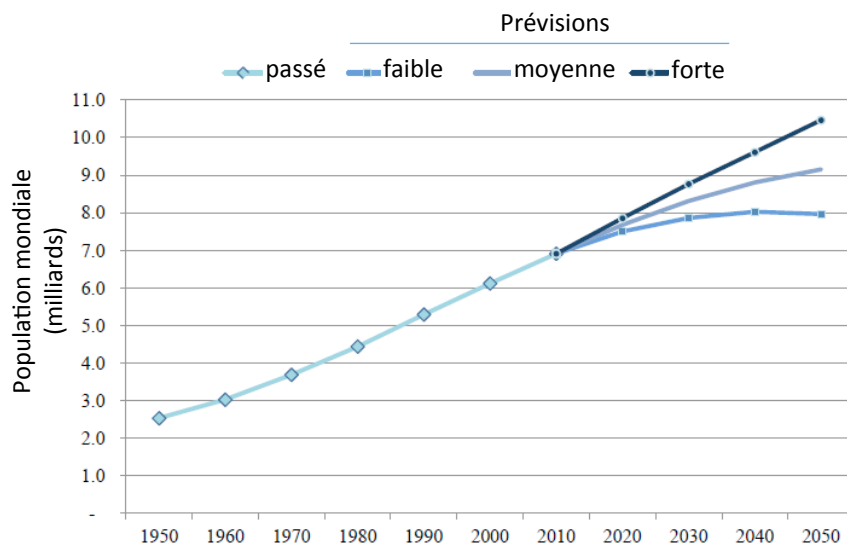
Si l'amélioration variétale constitue aujourd'hui une des pistes les plus exploitées pour obtenir des produits récoltés de meilleure qualité nutritionnelle, d'autres stratégies de moins longue haleine, telle que l'utilisation de biostimulants peut également être envisagée pour « biortifier » les produits récoltés, c'est-à-dire pour améliorer leur teneur en un ou plusieurs nutriments. Cependant, à notre connaissance, les travaux conduits sur les biostimulants ont pour la plupart montré des effets bénéfiques sur la croissance et/ou une meilleure résistance aux stress biotiques et abiotiques des plantes traitées, sans prendre en compte l'effet de ces biostimulants sur la qualité des produits récoltés. Dans ce contexte, les travaux réalisés par Jannin *et al.* (2012 ; 2013) dans le cadre du projet AZOSTIMER ne font pas exception à cette règle puisque l'étude de l'effet des effets d'AZAL5 et HA7 sur la gestion des macro (autres que N et S) et des micronutriments est énoncée par ces auteurs comme une des perspectives intéressante de leur travaux.

Ce travail de thèse s'inscrivant dans la continuité du travail doctoral réalisé par L. Jannin dans le cadre du projet AZOSTIMER, je me suis appliqué à vérifier l'hypothèse d'une biofortification en micronutriments des différents tissus (partie aérienne et partie racinaire) du colza en réponse aux deux biostimulants précédemment caractérisés, à savoir AZAL5 et HA7. En parallèle, ce travail de thèse avait également pour objectif d'améliorer nos connaissances sur la gestion des microéléments par les plantes et en particulier par le colza. En effet, à long terme, si la sélection variétale constitue une solution idéale pour améliorer les variétés cultivées, une sélection optimale nécessite un approfondissement de nos connaissances sur les mécanismes d'absorption, d'utilisation et de remobilisation des nutriments. A l'heure actuelle, ces connaissances sont très lacunaires (en particulier pour la remobilisation) pour des micronutriments majeurs tels que le Cu, le Mg et le Zn. Ce second volet, beaucoup plus fondamental, s'attachera donc à démontrer s'il existe (ou non) une remobilisation de ces éléments chez le colza et, le cas échéant, à mieux appréhender les processus sous-jacents à cette remobilisation. Cette étape semble être un préalable à l'identification ou à la création de nouvelles

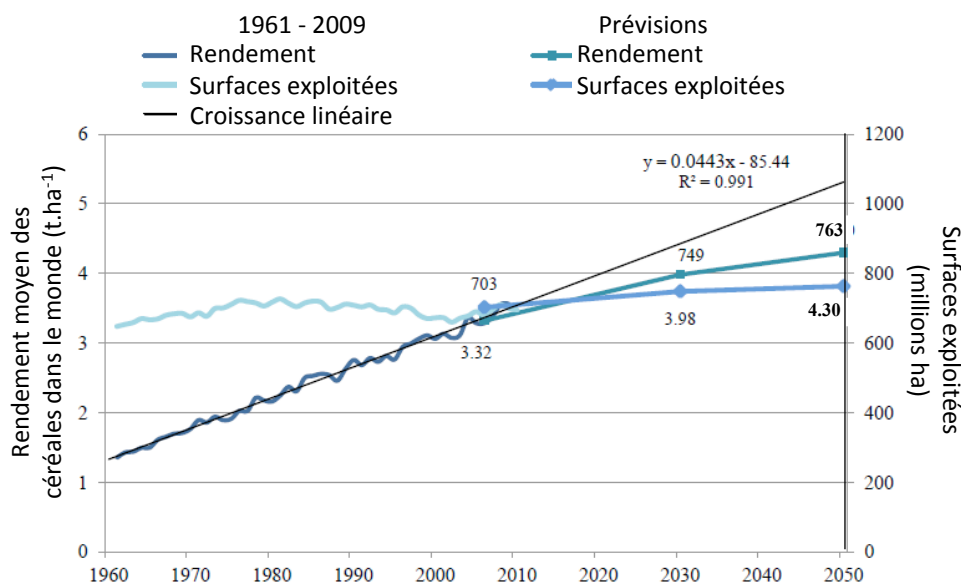


variétés de plantes de grande culture présentant une meilleure capacité à remobiliser les nutriments et donc la qualité des produits de récolte serait optimale.

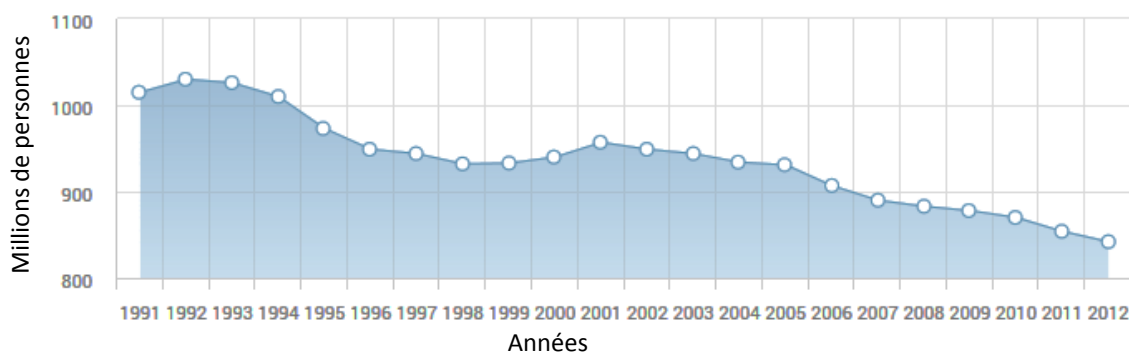
Ce travail doctoral a été possible grâce à une collaboration tripartite entre l'UMR INRA-UCBN 950 EVA structure d'accueil experte notamment en ce qui concerne la nutrition azotée du colza, Timac Agro International (groupe Roullier), co-financeur à 50% de cette thèse et acteur mondial dans la mise au point et la commercialisation de fertilisants performants et respectueux de l'environnement, et la Région Basse Normandie, co-financeur à 50%. Après une partie introductive, ce manuscrit de thèse présentera les résultats obtenus au cours de ce travail doctoral sous la forme de 4 articles scientifiques dont 2 sont acceptés et 2 sont actuellement soumis dans des journaux internationaux à comité de lectures. Une discussion générale et une présentation des principales perspectives qui émanent de ce travail doctoral viendront conclure ce manuscrit.



**Figure I.1.** Population humaine mondiale de 1960 à 2010 et prévisions démographiques jusqu'en 2050 (a) avec trois scénarios envisagés pour l'accroissement de la population mondiale. (Données FAO Stat, 2014)



**Figure I.2.** Rendement céréalier, et surfaces agricoles exploitées depuis 1960 et projection jusqu'en 2050 (b). (données FAO Stat, 2014).



**Figure I.3.** Nombre de personnes (exprimé en millions) souffrant de malnutrition dans le monde entre 1991 et 2012. Ce nombre a fortement chuté depuis 1991. (données FAO Stat 2014).

# CHAPITRE 1 : Analyse bibliographique

---

## 1 La production agricole mondiale face aux besoins alimentaires humains

### 1.1 Augmenter la production agricole pour répondre à l'accroissement démographique

La demande alimentaire mondiale est en constante augmentation, reflétant la croissance de la population humaine (Figure I.1), actuellement de 7 milliards avec des projections démographiques envisageant une augmentation jusqu'à 8 ou 10,5 milliards, selon les scénarii, à l'horizon 2050 (Gerland *et al.*, 2014). La révolution agricole associée à la révolution industrielle du XXe siècle a permis la mise en place

*"How will the world be able to feed close to 9 billion people in 2050 and still maintain the ecosystems?"*

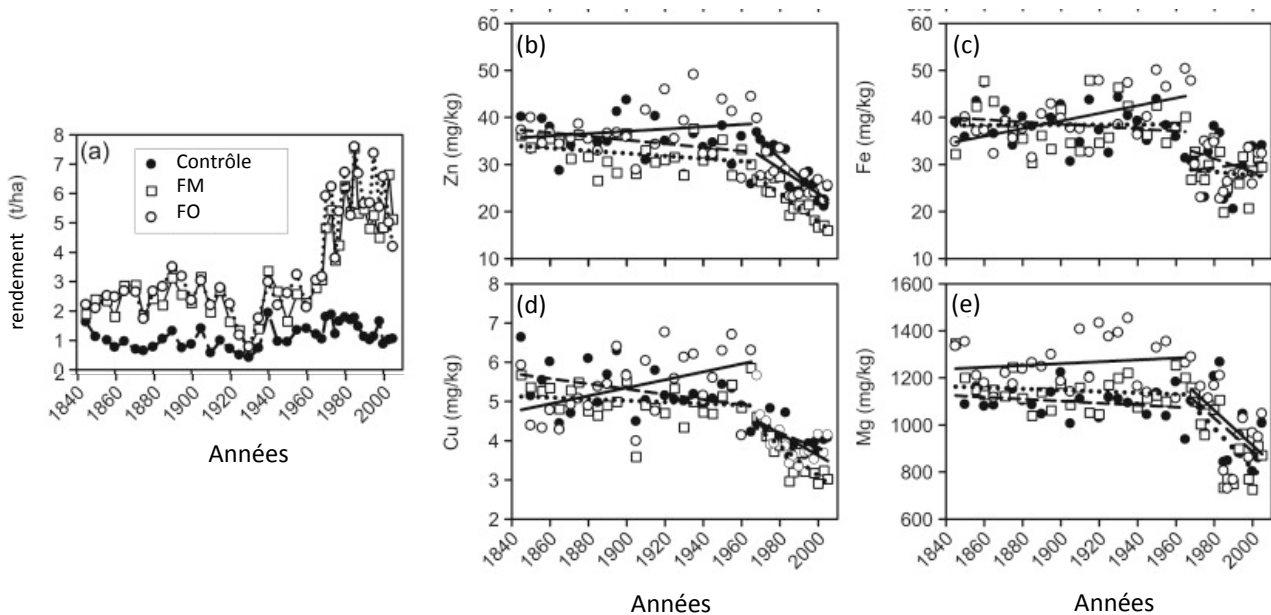
*"Comment le monde va-t-il nourrir près de 9 milliards de personnes en 2050 et maintenir les écosystèmes ? » Agrimonde,*

de cultures à haut rendement associée à une meilleure protection des cultures ainsi qu'une utilisation plus massive d'intrants (fertilisants minéraux, irrigation). Cela a eu pour effet de limiter les famines des temps passés (Europe 1693-1694 ; Irlande 1845-1849 par exemple) tout en permettant d'atteindre une autonomie alimentaire pour de nombreux pays. Il est actuellement admis qu'un tiers de l'accroissement de la productivité gagnée dans les années 1970-1980 est lié à l'utilisation de fertilisants (FAO, 2013). A titre d'exemple, on considère à ce jour que le gain de productivité agricole obtenu grâce à la fertilisation a permis de nourrir 48% de la population mondiale (Horst, 2013).

En conséquence, la proportion mondiale de personnes sous alimentées a tendance à reculer (passant de 1,02 milliard en 1991 à 842 millions en 2012 (FAO, 2013) Figure I.3). Toutefois, dans les années à venir, cette tendance pourrait s'inverser, au moins dans certaines zones géographiques sensibles puisque les modèles de prévision montrent que la production agricole pourrait stagner alors que la population mondiale devrait continuer d'augmenter (Figures I.1 et I.2). Parallèlement, les surfaces utilisables pour la production agricole restent restreintes et sont soumises par ailleurs à une concurrence accrue résultant de l'accroissement des surfaces occupées par des cultures non alimentaires telles que celles destinées à la production de bio-carburants ou des plastiques agrosourcés. Actuellement, l'augmentation des surfaces cultivables fait appel à des stratégies dont les



**Figure I.4.** Vue aérienne de la ferme de Rothamsted (Royaume Uni), montrant une partie des parcelles de blé de l'expérience de Broadbalk.



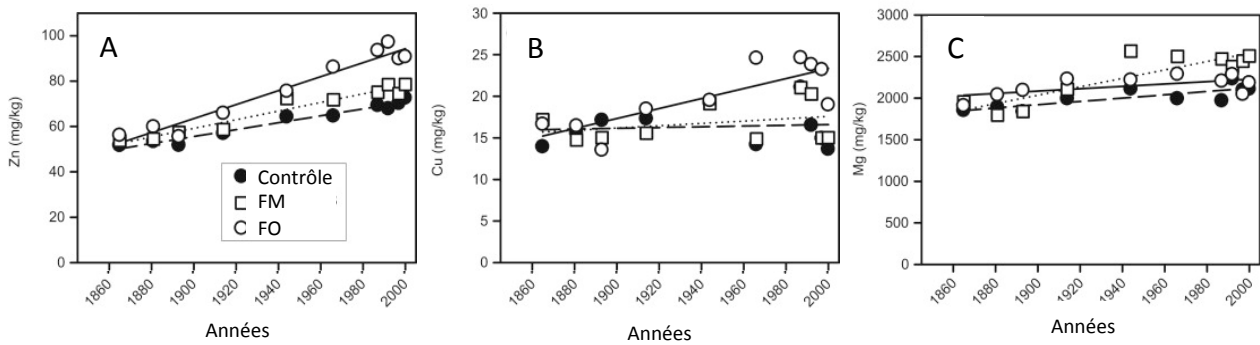
**Figure I.5.** Evolution des caractéristiques de la production de blé depuis 1945 à Rothamsted. Rendement en tonnes.ha<sup>-1</sup>(a), teneurs des grains de blé en Zn (b), Fe (c), Cu (d) et Mg (e) en mg.kg<sup>-1</sup>. Trois types de fertilisations ont été testés (ligne discontinue : sans fertilisation (contrôle), pointillés : fertilisation minérale (FM) N, P, K, Na, Mg, S (si possible indiquer les quantités apportées en chaque élément) et ligne pleine : fertilisation organique (fumier, FO). D'après Fan *et al.*, 2008.



conséquences écologiques sont largement évoquées telles que la déforestation ou l'usage massif de fertilisants pour amender des terres jusqu'alors oligotrophes. A titre d'exemple, Barona *et al.* (2010) ont montré qu'entre 2000 et 2006, la déforestation d'1 million d'hectares de forêt amazonienne a permis d'augmenter les surfaces cultivées en soja. Toutefois, en dépit de ces stratégies, les surfaces cultivables restent peu extensibles et si on se réfère aux prévisions de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (Food et Agriculture Organisation, FAO) et de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), il est probable que la production alimentaire agricole mondiale devienne insuffisante pour répondre aux besoins alimentaires de la population humaine à l'horizon 2050 (Figure I.1a, b, c, Alexandratos *et al.*, 2012 ; Ray *et al.*, 2013).

## 1.2 L'augmentation du rendement des produits récoltés ne s'accompagne pas toujours d'un maintien de la qualité

Au-delà de l'aspect quantitatif de la production agricole, les composantes qualitatives des produits récoltés sont actuellement de plus en plus considérées. Par exemple, l'expérimentation de Broadbalk (5 ha, divisés en 17 parcelles), lancée en 1848 et toujours en cours au sein de la ferme expérimentale de Rothamsted en Angleterre (Figure I.4), vise à évaluer l'évolution du rendement du blé en fonction de différentes fertilisations (absence de fertilisation, fertilisants chimiques ou organiques). Les paramètres environnementaux tels que la pluviométrie et la température ont été enregistrés alors que des échantillons de chaque récolte ont été conservés, de même que des échantillons de sol. Tout au long de l'expérimentation, seize cultivars, les plus utilisés en Angleterre, se sont succédés. En 1968, l'expérience s'est complexifiée avec l'ajout de nouvelles conditions de culture (rotation ou non des cultures, utilisation de pesticides ou herbicides, etc.), en délaissant les cultivars traditionnels pour des cultivars demi-nains, ayant un rendement bien supérieur à leurs prédécesseurs (Figure I.5a). En 2008, l'équipe de Fan *et al.* a analysé la qualité de 362 échantillons de grains récoltés depuis 1845 jusqu'à 2005. Ils ont, en particulier, comparé le rendement et la teneur des graines en Fer (Figure I.4c), Zinc (Figure I.4d), Cuivre (Figure I.4d) et Magnésium (Figure I.4e), micro et macroéléments d'importance non seulement pour le végétal mais aussi pour les consommateurs. Leur étude a montré que la teneur en Zn, Cu, Mg et Fe dans les grains de blé n'a cessé de décroître depuis l'introduction des variétés demi-naines (Figure I.5b-e) (Fan *et al.*, 2008). En moyenne, entre 1845 et 1967, la



**Figure I.6.** Variations des teneurs ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) en Zn (A), Cu (B), et Mg (C) du sol de trois parcelles de l'expérience de Broadbalk ayant reçu trois types de fertilization: Contrôle: aucune fertilisation; FM: Fertilisation Minérale (N, P, K, Na, Mg et S) ; FO: Fertilisation organique (fumier) Les lignes représentent les régressions linéaires pour les trois types de fertilisation : ligne discontinue : sans fertilisation (contrôle) ; ligne pleine: fertilisation minérale N, P, K, Na, Mg, S ; ligne pointillée fertilisation organique. D'après Fan *et al.*, 2008.

L'augmentation des rendements céréaliers résultant de la sélection variétale, s'accompagne depuis 1970 d'une réduction des teneurs en grains en Fe, Mg, Zn et Cu qui n'est pas due à une oligotrophisation des sols.

teneur en Zn dans les grains de blé était de 33,2 mg.kg<sup>-1</sup> puis a chuté à 24,3 mg.kg<sup>-1</sup> sur la période 1968-2005 avec l'apparition des cultivars demi-nains. De la même manière, les teneurs

en Fe, Cu et Mg dans les grains sont passées, respectivement, de 38,2 mg.kg<sup>-1</sup>, 5,4 mg.kg<sup>-1</sup> et 1138 mg.kg<sup>-1</sup> à 29,7 mg.kg<sup>-1</sup>, 3,9 mg.kg<sup>-1</sup> et 924 mg.kg<sup>-1</sup>. Cette étude, conduite sur le long terme (plus de 150 ans) montre donc que l'introduction des variétés à haut rendement a eu un effet négatif sur les teneurs et les quantités de nutriments dans les grains de blé. Ce résultat a été confirmé par une étude conduite aux Etats-Unis entre 1920 et 2000 (Garvin *et al.*, 2006) et qui montre que la qualité nutritionnelle du grain de blé pour ces éléments minéraux, donc en dehors de l'aspect strictement énergétique (glucides, lipides et protéines notamment), était inversement proportionnelle au rendement.

### 1.3 Origine de la perte de qualité

La teneur en Zn, Mg et Cu dans le sol de la ferme n'est que peu différent de celui de 1845 (Figure I.6) et la perte de qualité ne serait donc pas due à une oligotrophisation des sols en Zn, Mg, Cu et Fe. Selon plusieurs auteurs (Bouis, 2000 ; Welch and Shuman, 1995), les politiques de recherche et développement, essentiellement orientées vers des perspectives d'augmentation de rendements, n'ont pas (ou peu) retenu la teneur en micronutriments des produits récoltés comme critère de sélection variétale. En effet, au cours des différentes révolutions agricoles, les organismes de recherche agronomique (FAO dans le monde, INRA en France, USDA aux Etats-Unis, etc.) ont, la plupart du temps, abordé la qualité nutritive en s'intéressant uniquement aux molécules à fort pouvoir énergétique tels que les sucres complexes (l'amidon en particulier), les acides gras (huiles) et dans une moindre mesure les protéines. Ainsi, au niveau mondial, la sélection variétale a permis de maintenir voire d'améliorer les teneurs en C (composant les sucres et les acides gras) et N (pour les protéines), mais l'essentiel des minéraux et des vitamines n'a pas ou peu été pris en compte.

Ainsi, si la sélection variétale a permis de répondre aux besoins alimentaires en termes de quantité de nourriture et d'énergie, l'abaissement de la qualité des produits récoltés pourrait être à l'origine de déficiences nutritionnelles dont l'occurrence pourrait fortement augmenter chez les consommateurs. Ce phénomène,



appelé « hidden hunger » ou « faim cachée », pourrait être amplifié par d'autres facteurs, notamment les contextes socio-économiques des populations les moins favorisées.

#### 1.4 La « faim cachée », un paradoxe alimentaire ?

Les contextes socio-économiques ont une influence directe sur les comportements alimentaires des populations. Ainsi, les populations défavorisées se dirigent vers les denrées de première nécessité que sont les céréales et les tubercules

La **déficienc**e est le manque d'un nutriment ou d'une vitamine dans l'alimentation.

La **carenc**e est une déficienc

riches en féculents. En effet, ces aliments apportent plus de calories pour un coût bien moins élevé que d'autres denrées telles que les fruits,

les légumes ou les protéines animales. De cette manière, même si la nourriture dans les pays en voie de développement devient de plus en plus accessible, elle est de moins en moins variée sous la pression économique (Bouis, 2000). Aujourd'hui, 46% des denrées consommées dans le monde sont des céréales (FAO, 2013). Or, dans un régime équilibré, l'essentiel du Fe, Zn et de la vitamine A est apporté en consommant des denrées autres que les céréales (Figure I.8).

Les carences en nutriments liées à cette « faim cachée » ne touchent pas seulement les pays en voie de développement. En effet, des carences en Fe sont régulièrement rapportées (principalement chez les femmes) dans des pays développés tels que la France, le Royaume-Uni ou les Etats-Unis. Les organismes de surveillance sanitaire reportent également des carences de plus en plus importantes en Zn, Mg ou Cu, à l'origine de troubles métaboliques chez des populations pourtant à l'abri de la famine (Cogswell *et al.*, 2009 ; Ruston *et al.*, 2004).

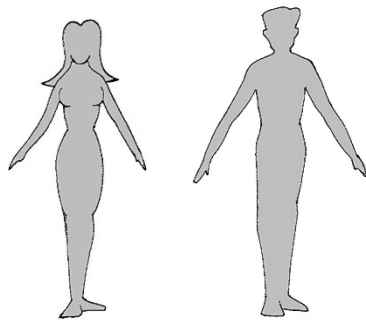
Selon l'OMS et la FAO, 7,3% des maladies létales seraient liées à une carence en micronutriments (Allen *et al.*, 2006). Par exemple, la carence en Fe serait responsable à elle seule de 1,5% des décès au niveau mondial.

Dans le monde, 7,3% des maladies létales seraient liées à une carence en micronutriments. Allen *et al.* (2006).

## 2. Fer, magnésium, cuivre et zinc : des éléments essentiels à la santé humaine

### 2.1 Le Fer (Fe)

Un corps humain adulte contient en moyenne 3 grammes de fer. Les Apports Journaliers Recommandés (AJR, Figure I.7) en fer ont été estimés à 9 mg/j pour

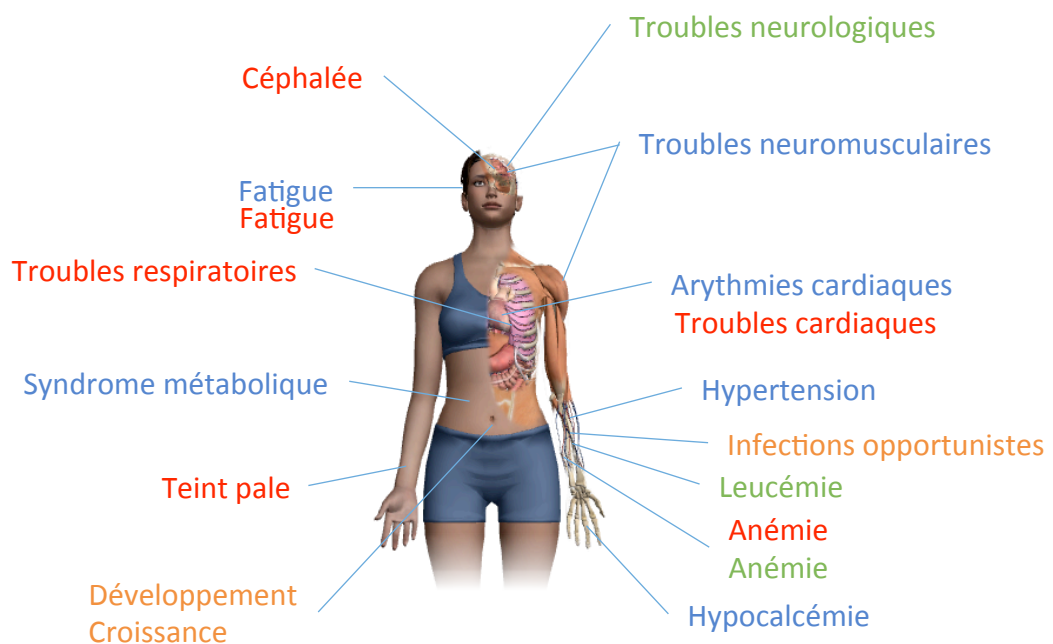


Élément	AJR (Femme)	AJR (Homme)
Fe	16 mg	9 mg
Mg	360 mg	420 mg
Zn	10 mg	12 mg
Cu	1,5 mg	2mg

**Figure I.7.** Apport Journalier Recommandé (AJR) moyen en fer (Fe), magnésium (Mg), zinc (Zn) et cuivre (Cu) chez la femme (ni enceinte, ni allaitante, ni ménopausée) et l'homme adulte. Données ANSES, 2013.

Élément	Aliment	Teneur (mg/100g)
Fe	Boudin noir	22,8
	Chocolat noir 40% cacao	18,2
	Épinard	15,7
Mg	Sel marin non iodé	503
	Sardine à l'huile	467
	Noix du Brésil	366
Zn	Huitre	21,3
	Foie de veau	13,2
	Bœuf braisé	10,5
Cu	Hareng mariné	120
	Foie de veau	20,1
	Pain de mie	2,6

**Figure I.8.** Principaux aliments riches en Fe, Mg, Zn et Cu. Les teneurs élémentaires sont indiquées en mg.100 g<sup>-1</sup> d'aliment. Données ANSES, 2013.



**Figure I.9.** Symptômes chez l'homme associés à une carence en Fe (rouge), Mg (bleu), Zn (orange) et Cu (vert). Données issues de Binet (2009), Rayssigier *et al.* (2010), Hambridge (2000) Halfdanarson *et al.* (2008) et Zatta and Frank (2007),

l'homme et à 16 mg/j pour la femme non ménopausée. Ils varient de 7 à 14 mg/jour chez les enfants de 3 à 17 ans. En moyenne, seulement 10% du fer ingéré est absorbé. Le fer sous forme hémique est beaucoup plus absorbable que les autres formes. Ainsi, s'il ne représente qu'un tiers des apports, le fer hémique représente deux tiers du fer absorbé (Briat and Vert, 2004).

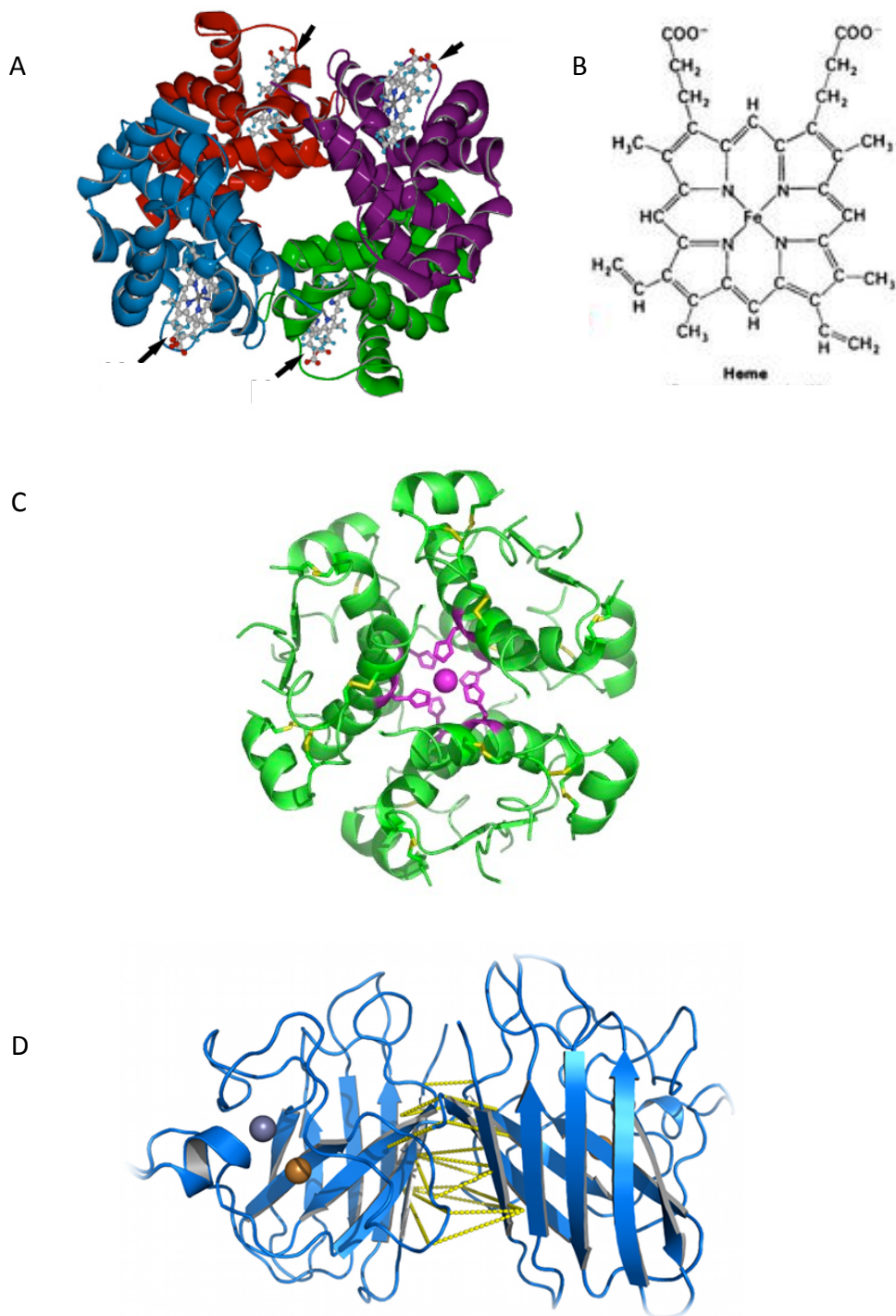
Deux milliards de personnes seraient déficientes en Fe dans le monde (Pinstrup-Andersen, 2005). D'un point de vue physiologique, le Fe rentre dans la composition de l'hémoglobine (70% du Fe de l'organisme), molécule dont le cœur est constitué d'un atome de fer enchâssé dans une structure hémique (Figure I.10a). Cette structure lui permet la fixation du dioxygène et son transport dans tout le corps humain au sein des globules rouges du sang. L'efficacité de l'hémoglobine est la première touchée par un déficit en fer. Ainsi, une carence en fer chez l'humain (Figure I.9) se traduit par une anémie associée à une fatigue chronique pouvant être accompagnée de troubles cardiaques, de difficultés respiratoires, de céphalées, et d'une déstabilisation des épithéliums digestifs ou tégumentaires.

## 2.2 Le Magnésium (Mg)

Chez l'homme, la moitié de la quantité de magnésium est localisée dans les tissus osseux. Ce cation joue également un rôle majeur dans la régulation du métabolisme glucidique, notamment en modulant l'activité de l'hexokinase, de la phosphofructokinase et de la phosphoglycératokinase (Laughlin and Thompson, 1996). L'apport Journalier Recommandé est donc de 360 et 420 mg chez la femme et l'homme, respectivement (Figure I.7). D'un point de vue clinique, une carence en Mg toucherait 10% de la population mondiale (Swaminathan, 2003) et induit une fatigue chronique, des troubles neuromusculaires et une arythmie cardiaque (Figure I.9). De plus, il a été proposé un lien entre la carence Mg et l'apparition du syndrome métabolique, qui préfigure l'apparition de maladies tels que le diabète de type II et des affections cardiovasculaires telles que les accidents vasculaires cérébraux (Rayssiguier *et al.*, 2010).

## 2.3 Zinc (Zn)

Chez l'humain, la carence en Zn a longtemps été considérée comme inexistante. Ce n'est qu'en 1961 que l'hypothèse d'une déficience en Zn a été évaluée (Prasad *et al.*, 1961). L'apport journalier actuellement recommandé en Zn



**Figure I.10.** Exemples de métalloprotéines humaines. **A:** Tétramère d'hémoglobine (les flèches pointent les noyaux hèmes) et **B:** structure de noyau hème. **C:** Hexamère d'insuline (chaines en vert), stabilisé par un atome de Zn (violet). **D:** Zn-Cu superoxyde dismutase (Zn en bleu et Cu en orange). Pour chaque protéines, les structures en feuillettes (flèche) en hélices sont représentés. D'après Royer (1994) Chang *et al.* (1997) et Proctor *et al.* (2011).



est de 10 et 12 mg chez la femme et l'homme respectivement (Figure I.7). Aujourd'hui, on estime qu'entre 2 et 3 milliards de personnes dans le monde auraient un apport insuffisant en Zn (Brown *et al.*, 2001). Le zinc est un élément essentiel à la synthèse et à la conformation de complexes enzymatiques majeurs tel que l'insuline (Figure I.10b), qui régule la glycémie. En outre, le Zn entre dans la composition de certaines protéines « à doigt de Zn », facteurs qui régulent la transcription de nombreux gènes (voir partie 3.3.1.3). Une déficience sévère en Zn (Figure I.9) se traduit par un retard de croissance chez les jeunes enfants ainsi que des troubles du système immunitaire dans l'ensemble de la population (Hambidge, 2000). En effet, le Zn est particulièrement important dans le développement, la différenciation et l'efficacité des lymphocytes (Shankar and Prasad, 1998). Ainsi, la carence en Zn est sous-jacente à de nombreuses maladies telle que la diarrhée (Sazawal *et al.*, 1995) et peut favoriser l'évolution d'autres maladies telles que la pneumonie (Bhutta *et al.*, 1999), la malaria (Caulfield *et al.*, 2004) ou le SIDA (Siberry *et al.*, 2002).

En conséquence, la plupart des patients souffrants d'une légère carence en Zn ne serait traité que pour les maladies opportunistes qui apparaîtraient ou s'aggravaient suite à cette carence. De plus, techniquement, le diagnostic d'une carence en Zn est compliqué car aucun biomarqueur n'est à ce jour identifié pour refléter une carence en Zn. A cause de sa régulation particulière, le taux de Zn dans le plasma n'est pas pertinent et seul un ensemble de faisceaux de présomptions (basés sur les apports journaliers du patient ou des symptômes décrits précédemment, par exemple) permettent d'identifier la carence, ce qui tend à diminuer la détection d'une faible déficience. En conséquence, l'apport de Zn suffisant par le biais de la consommation d'aliments riches en Zn (Figure I.8) reste actuellement l'un des moyens les plus efficaces pour éviter d'éventuelles déficiences ou carences en Zn.

## 2.4 Cuivre (Cu)

Des déficiences en Cu sont très peu rapportées chez l'homme. La prévalence de ce métal étant assez importante dans les sols, il est en théorie apporté en quantité suffisante même par une alimentation pauvre et/ou peu variée. Toutefois, tout comme le Zn, la faible occurrence des carences en Cu serait également liée à des difficultés de diagnostic (Halfdanarson *et al.*, 2008). Les apports journaliers



recommandé pour le Cu sont fixés à 1,5 et 2 mg chez la femme et l'homme, respectivement (Figure I.7).

Au niveau cellulaire, certaines enzymes telles que la Zn-Cu superoxyde dismutase (Figure I.10c), une métallo-enzyme impliquée dans la détoxification des radicaux libres, ont besoin de Cu pour avoir une activité optimale. De même, les oxydases multi-cuivres sont des enzymes clés dans l'absorption du Fe (Vashchenko and MacGillivray, 2013), reliant les deux métabolismes. Ainsi, les symptômes d'une carence en Cu se rapprochent d'une carence en Fe (Figure I.9), avec l'apparition de troubles hématologiques tels qu'une anémie ou une baisse du taux de leucocytes (Halfdanarson *et al.*, 2008), mais également des troubles neurologiques (Zatta and Frank, 2007).

Selon de nombreux auteurs, parmi les éléments minéraux requis pour la nutrition humaine, le Fer, le Magnésium, le Zinc et le Cuivre sont à considérer avec plus d'attention que celle dont ils font actuellement l'objet.

### 3. Comment améliorer la teneur en Zn, Cu, Mg et Fe des tissus végétaux récoltés

#### 3.1 Par biofortification

##### 3.1.1 Principes

La qualité et la variabilité des aliments constitutifs du bol alimentaire représentent des leviers potentiels d'amélioration pour limiter le risque de carences

La **supplémentation** est l'apport de vitamines et minéraux sous forme de compléments alimentaires.

La **fortification** consiste à augmenter la teneur en vitamines ou minéraux dans l'alimentation.

La **biofortification** est une fortification d'un organisme destiné à être consommé (plante, animal) lors de son développement.

élémentaires chez le consommateur. Toutefois, ces leviers sont difficiles à actionner d'une part, parce qu'ils font appel à des stratégies à long terme telles que la sélection variétale et

d'autre part, parce qu'ils nécessitent des changements de comportements alimentaires de la part des populations carencées. Considérant ces difficultés, les pouvoirs publics orientent leurs programmes vers d'autres stratégies telles la supplémentation ou la fortification. La supplémentation consiste à apporter de grandes quantités de microéléments et de vitamines par des compléments alimentaires, sous forme de gélules ou comprimés. Elle a ainsi l'inconvénient de



passer pour un traitement médical et non comme un apport alimentaire. Le coût de la formulation et de la distribution de tels apports est également non négligeable. Pour la fortification, des micronutriments sont ajoutés dans les produits de consommation. Ainsi, à partir des années 1920, les pays développés ont commencé à consommer le sel de table iodé, permettant de réduire fortement des symptômes de goitre et de retards mentaux chez les enfants en diminuant très fortement les cas de carence en iode (Rendig, 1984). Aucun changement de comportement alimentaire n'est alors nécessaire. La biofortification constitue une forme particulière de fortification. Ainsi, l'augmentation de la teneur en nutriments dans la nourriture ne se fait pas au cours du processus de transformation de l'aliment mais au niveau de la production de la matière première, c'est-à-dire lors de la culture de la plante. Plus spécifiquement, la biofortification consiste à enrichir les parties consommées de la plante en composés d'intérêt. Ces composés sont généralement des microéléments (Fe et Zn majoritairement) ou des provitamines (beta carotène).

La biofortification nécessite la maîtrise des paramètres physiologiques régulant les flux du composé d'intérêt dans la plante. Ainsi, doivent être pris en compte (i) la disponibilité du nutriment dans la rhizosphère, (ii) l'efficacité du système d'absorption racinaire, (iii) la translocation vers les organes récoltés et (iv) le stockage du nutriment (et notamment la quantité stockée et la forme de stockage) et sa remobilisation vers les tissus récoltés (Palmgren *et al.*, 2008). L'objectif de la biofortification consiste à optimiser le stockage d'éléments d'intérêt dans la partie récoltée et comestible, si possible sous sa forme la plus facilement assimilable. La biofortification est considérée comme une des stratégies d'amélioration de la qualité nutritionnelle des produits récoltés. Afin d'atteindre cet objectif, plusieurs pistes sont actuellement largement étudiées.

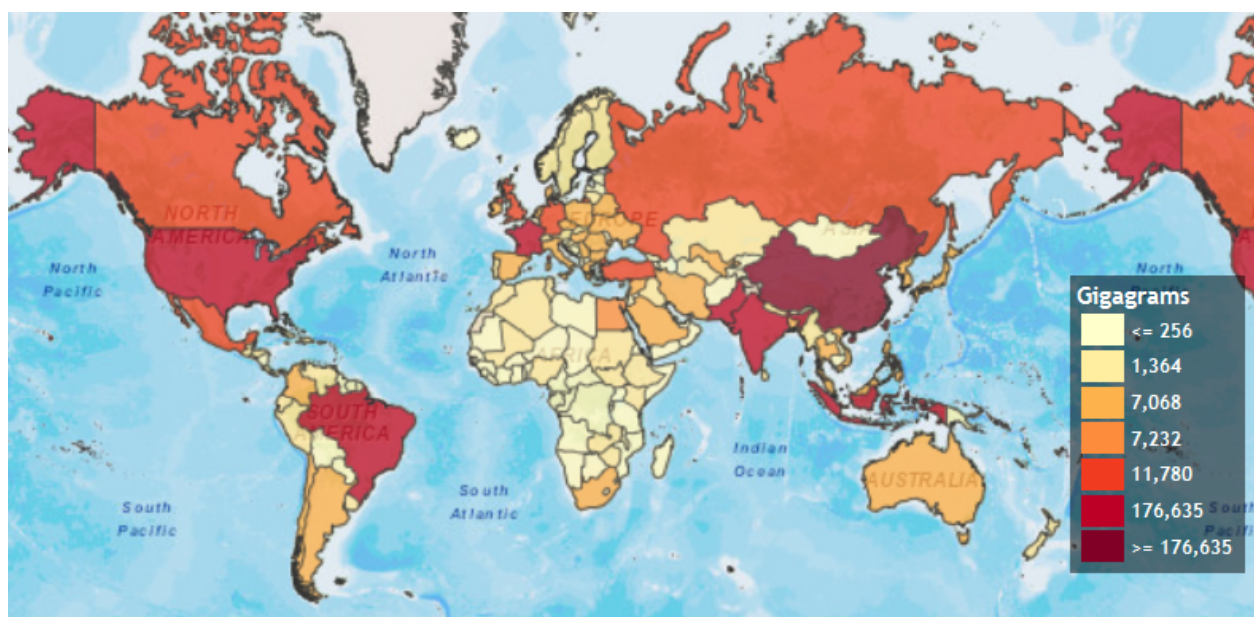
4 cibles en biofortification:

- Disponibilité dans le sol
- Absorption
- Translocation
- Stockage et remobilisation

### 3.1.2 Les méthodes de biofortification

#### 3.1.2.1 La fertilisation

D'une façon générale, l'efficacité de la fertilisation n'est plus à démontrer. La première révolution verte est née de l'industrialisation permettant la production ou l'acheminement de fertilisants azotés et potassiques à moindre coût. Dans les années 1930, l'utilisation d'engrais à base de matériaux bruts naturels était la norme. Outre les gisements naturels de phosphate ou de potasse, les déchets animaux et



**Figure I.11.** Emissions de gaz à effet de serre dues à la fertilisation, par pays (Moyenne 1990-2011 en équivalent CO<sub>2</sub>, exprimée en gigagrammes). D'après FAOSTAT, 2012.

végétaux étaient mis à contribution. Les os broyés constituaient un apport de P, alors que le K était le plus souvent apporté par épandage de cendres. L'azote était majoritairement apporté sous forme organique et provenait du fumier et du guano. Actuellement, il est apporté sous forme de nitrate, dont le procédé de production à partir de méthane a été mis au point par Fritz Haber en 1909, puis industrialisé par Carl Bosch au sein de l'entreprise BASF (d'où l'appellation de « procédé d' Haber-Bosch»). Ce procédé permet la production de nitrate d'ammonium ou d'urée, beaucoup plus stables, et pouvant être apportés aux cultures selon la dose souhaitée. Longtemps considéré comme peu onéreux, ce procédé utilise comme matières premières de l'azote atmosphérique (gratuit et inépuisable), mais également du gaz naturel (méthane) dont le coût, indexé sur celui du pétrole, augmente depuis quelques années. P et K sont eux toujours issus de gisements de phosphate et de potasse qui ne sont pas inépuisables, à tel point que certains annoncent déjà une crise du K suite à leur épuisement prévu pour 2030-2080 selon les différentes estimations (Horst, 2013).

Outre l'aspect économique, l'utilisation intensive de fertilisants a conduit à certains désastres environnementaux. Dans le cas de l'azote, le nitrate, molécule fortement lessivable, se retrouve dans les eaux de ruissèlement puis dans les nappes phréatiques. L'une des conséquences environnementales de la fertilisation azotée concerne l'eutrophisation des eaux pouvant conduire, par exemple, à l'accumulation particulièrement médiatisée d'algues vertes sur les plages bretonnes. En outre, le nitrate provenant de la fertilisation nitrique ou de l'oxydation de l'ammonium du sol *via* le processus de nitrification (Mariotti *et al.*, 1981) peut également être réduit, *via* des bactéries pédosphériques à activité dénitrifiantes, en protoxyde d'azote (N<sub>2</sub>O), un gaz contribuant significativement à l'effet de serre. Les effets environnementaux du N<sub>2</sub>O ont été estimés par la FAO à 683 484 Gg eq. CO<sub>2</sub> dans le monde, dont 13 232 Gg eq. CO<sub>2</sub> en France (Figure I.11). De manière générale, tant du point de vue économique qu'environnemental, la tendance actuelle vise à réduire l'utilisation des intrants par différentes méthodes (sélection de géotypes plus efficaces, agriculture de précision, etc.). Ainsi, depuis 1989, les émissions de gaz à effets de serre dues à l'agriculture ont diminué en Europe avec un taux moyen de 2,1% par an (FAO, 2013).

En dépit de ces inconvénients, la fertilisation reste aujourd'hui le moyen le plus couramment utilisé en biofortification puisqu'elle permet d'agir directement sur





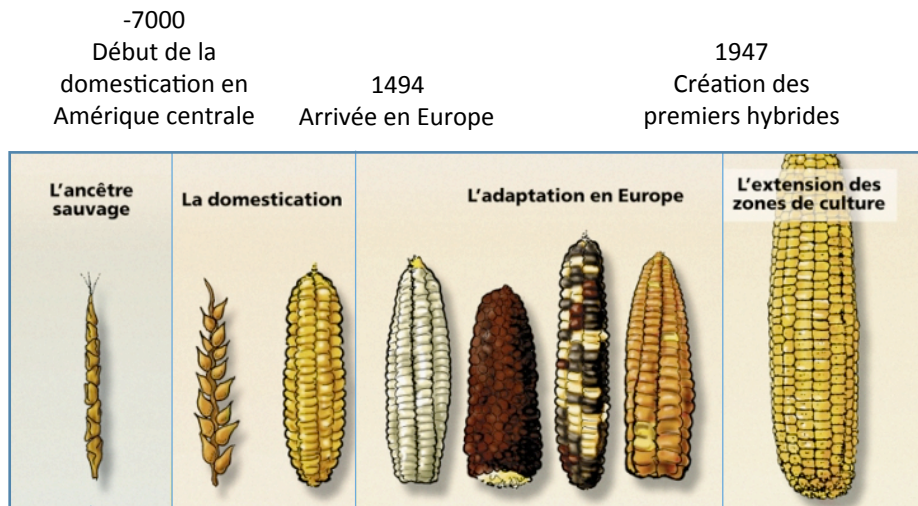
la disponibilité en nutriments et permet une levée de carence éventuelle. A titre d'exemple, pour une biofortification en Zn, la forme la plus courante de biofortification est constitué d'un apport foliaire de  $ZnSO_4$  (Marschner, 2012). Il implique cependant que le composé soit absorbable par les feuilles, ce qui n'est pas toujours le cas. En effet, l'acquisition foliaire de certains ions peut être très faible, *via* les stomates ou les défauts de la surface foliaire (Fernandez *et al.*, 2013). Ainsi, pour certains éléments peu absorbables au niveau foliaire tels que le magnésium et l'iode, par exemple, l'apport au sol reste le plus efficace (Cao *et al.*, 1994 ; Draycott and Allison, 1998). Ainsi, le Mg est apporté majoritairement à la surface des sols sous forme d'oxyde de magnésium ( $MgO$ ), qui présente en plus l'avantage d'être un fertilisant à libération lente (Draycott and Allison, 1998). En Europe, les surfaces utilisées pour la culture de céréales sont généralement amendées en Cu sous forme de sulfate de cuivre ( $CuSO_4$ ) à raison de 2 à 15 kg appliqué au sol à des intervalles de 5-15 ans (Alloway, 2013). L'apport de fer par fertilisant inorganique est peu utilisé car le Fe est rapidement oxydé, précipite et devient ainsi non-assimilable par les végétaux. Il peut cependant être apporté avec de meilleurs résultats sous une forme chélatée (Fe-EDTA ou Fe-EDDHA) qui protège le Fe de l'oxydation. Cependant, quelle que soit la forme apportée, le Fe reste un élément dont la mobilité au sein de la plante est faible (Alloway, 2013). En conséquence, les apports en Fe doivent être renouvelés fréquemment (White and Broadley, 2009).

En résumé, si les fertilisants traditionnels ont l'avantage d'être extraits (ou produits) plus ou moins facilement, les stratégies de biofortification des végétaux faisant appels à un apport de fertilisants peuvent avoir des conséquences environnementales et économiques non négligeables. Dans ce contexte, d'autres stratégies de biofortification telles que l'amélioration variétale ou encore, l'utilisation de biostimulants sont autant de stratégies alternatives qui méritent crédit.

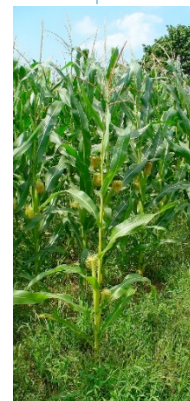
### 3.1.2.2 *L'amélioration génétique*

#### 3.1.2.2.1 Sélection variétale

La sélection de plantes plus productives ou plus résistantes aux maladies a été pendant très longtemps réalisée de manière intuitive. En effet, depuis toujours, les espèces cultivées naturelles présentent une variabilité phénotypique, notamment en termes de rendement. Les graines des plantes ayant les épis les plus productifs étaient ressemées en espérant que la culture de l'année suivante soit aussi productive

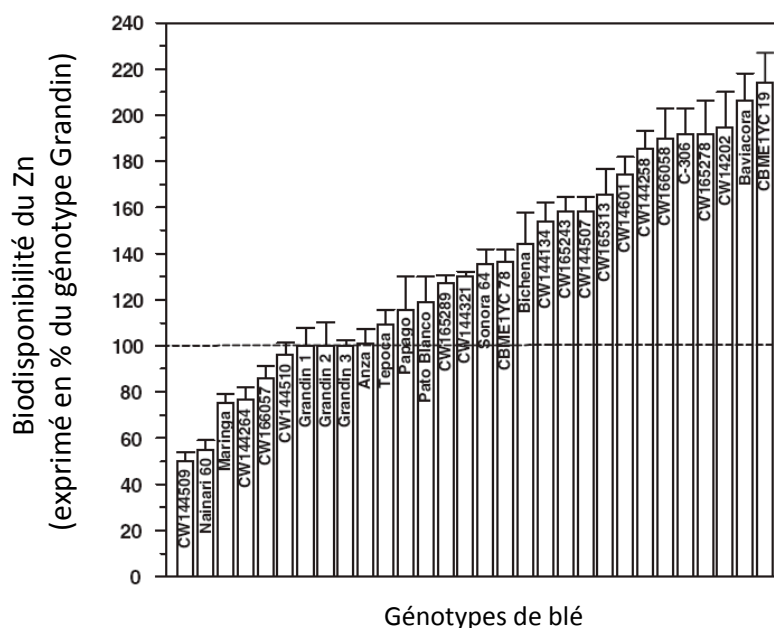


Téosinte (ancêtre du maïs)



Maïs moderne

**Figure I.12.** Le maïs: de la sélection massale aux variétés hybrides. Les variétés primitives de maïs sont apparues au Mexique par sélection massale et domestication de la téosinte, ancêtre du maïs. Introduite en Europe au XV<sup>e</sup> siècle, l'adaptation de ces variétés primitives a permis l'obtention de variétés qui ont été cultivées jusqu'au milieu du XX<sup>e</sup> siècle. A partir de 1947, l'évolution des techniques de sélection variétale a permis l'obtention et la mise sur le marché de variétés hybrides modernes, dont le rendement est bien meilleur. D'après GNIS 2014.



**Figure I.13.** Variabilité naturelle de la biodisponibilité en Zn dans les grains de 28 génotypes de blé. Les données sont exprimées en pourcentage du génotype Grandin, utilisé comme référence et dont la biodisponibilité des grains est représentée par la valeur 100%. Adapté de Welch *et al.*, 2005.

que celle sélectionnée précédemment. Cette sélection, qualifiée de « massale », car utilisant les semences provenant d'une population dans son ensemble, est peu efficace mais a tout de même permis une évolution des cultures pendant près de 10 000 ans.

Au milieu du XIX siècle, Louis de Vilmorin introduit le concept de sélection entre individus (de Vilmorin, 1886). Sa théorie sur l'hérédité chez les végétaux est rapidement certifiée par les travaux de Mendel qui devront cependant attendre le début du XXe siècle pour être considérés à leur juste valeur. La sélection devient plus efficace par la fixation de lignées pures issues de croisements répétés d'individus ayant un seul et même ancêtre. Puis par croisements entre ces lignées pures, il a été possible de créer de nouvelles lignées plus performantes. Les avancées en génétique et en biologie moléculaire ont également permis d'optimiser cette sélection génétique, depuis la description de la double hélice d'ADN par Watson et Crick (Watson and Crick, 1953), jusqu'au séquençage du génome des plantes (*Arabidopsis thaliana* en 2000 (Initiative Arabidopsis Genome, 2000), *Oriza sativa* en 2005 (Project International Rice Genome Sequencing, 2005), *Brassica napus* en 2014 (Chalhoub *et al.*, 2014) ) en passant par la mise au point de la PCR (Mullis and Faloona, 1987). Dans les années 1960 sont apparus les cultivars demi-nains, cumulant les caractéristiques des plantes à fort rendement mais à paille longue et fragile et des plantes naines, produisant peu de paille. Aujourd'hui, l'utilisation des hybrides de première génération permet d'obtenir de variétés stériles mais à très fort rendement comme chez le maïs par exemple (Figure I.12).

L'énorme avantage de ce type d'amélioration est qu'il est maîtrisé, qu'il ne pose aucun problème environnemental ou sociétal et se révèle très stable. N'ayant pas été sélectionnées sur leur teneur en micronutriments, les variétés actuelles présentent encore une forte disparité concernant ce critère. Par exemple, une étude a montré que la biodisponibilité du Zn dans des grains de 28 génotypes de blé pouvait varier d'un facteur 4 (Figure I.13) (Welch *et al.*, 2005). Ainsi, en sélectionnant de nouvelles variétés sur de nouveaux critères en plus du rendement (tels que la teneur en microéléments), il deviendra alors possible de contrebalancer les effets collatéraux des précédentes sélections qui ont conduit à une perte de la qualité nutritionnelle des produits récoltés.

Une nouvelle sélection variétale, prenant en compte certains critères de qualité en plus du rendement constitue une option à long terme pour lutter contre les carences.



Bien que cette technique basée sur des pratiques ancestrales ait fortement évolué, la sélection variétale n'en reste pas moins très longue. La mise au point d'une nouvelle variété ainsi que le délai requis pour la mise sur le marché peuvent atteindre une vingtaine d'années. Le programme Harvest Plus (Harvest Plus, 2014) fait figure d'exception et s'efforce de biofortifier par sélection variétale des cultures traditionnelles (riz (*Oryza sativa*), patate douce (*Ipomoea batatas*) et manioc (*Manihot esculenta*) parmi d'autres) de pays en voie de développement en moins de 10 ans. Mais la prévision d'une telle rapidité pour ce type de projet nécessite des moyens considérables qui ne pourront pas être reproduits pour chaque culture. Par ailleurs, ce type d'initiative est favorisé par une meilleure connaissance des mécanismes d'absorption, de transport, de stockage et d'utilisation du nutriment ou du composé d'intérêt par la plante. En effet, cette connaissance permet d'identifier les variabilités présentes dans une espèce donnée et de sélectionner les variétés sur des marqueurs fonctionnels de plus en plus précis afin d'obtenir de nouveaux cultivars (White and Broadley, 2005).

#### 3.1.2.2.2 Plantes génétiquement modifiées (PGM)

La technologie de transformation génétique (OGM) adaptée aux plantes pourrait permettre d'obtenir des résultats similaires à la sélection variétale mais dans des délais nettement plus courts car l'amélioration génétique y est beaucoup plus contrôlée. De plus, cette stratégie permet de répondre à certaines problématiques de biofortification auxquelles la sélection variétale ne pourrait pas répondre. C'est le cas par exemple du projet d'enrichissement du riz en provitamine A ou  $\beta$ -carotène. Une technologie OGM a permis la production de riz produisant de lui-même le  $\beta$ -carotène manquant aux populations, alors que le riz n'en produit pas naturellement. Le  $\beta$ -carotène étant de couleur orangé, le riz ainsi obtenu prend une couleur dorée et a pris le nom de « golden rice ».

Néanmoins, dans le contexte socio-environnemental actuel, les OGM sont sujets à controverses, notamment en ce qui concerne la maîtrise de cette technologie qui permet de franchir la barrière des espèces. En l'état actuel, la France devrait poursuivre une politique de précaution et à interdire les OGM pour un certain temps. Aussi, bien qu'elle puisse être très prometteuse, cette technologie ne semble pas la piste à privilégier actuellement pour répondre aux besoins de biofortification des végétaux.



### 3.1.2.3 Les biostimulants

#### 3.1.2.3.1 Généralités

Comme leur nom l'indique, les biostimulants ont une origine naturelle et stimulent la plante, que ce soit au niveau de la croissance, de la production d'organes d'intérêt (graines, fleurs, etc.) ou de la résistance à des pathogènes. Dans le cas d'une meilleure croissance, « stimulation » s'oppose ici à « nutrition ». En effet, il ne s'agit pas d'apporter des nutriments à la plante, mais d'améliorer son métabolisme afin qu'elle absorbe mieux les nutriments présents dans le sol

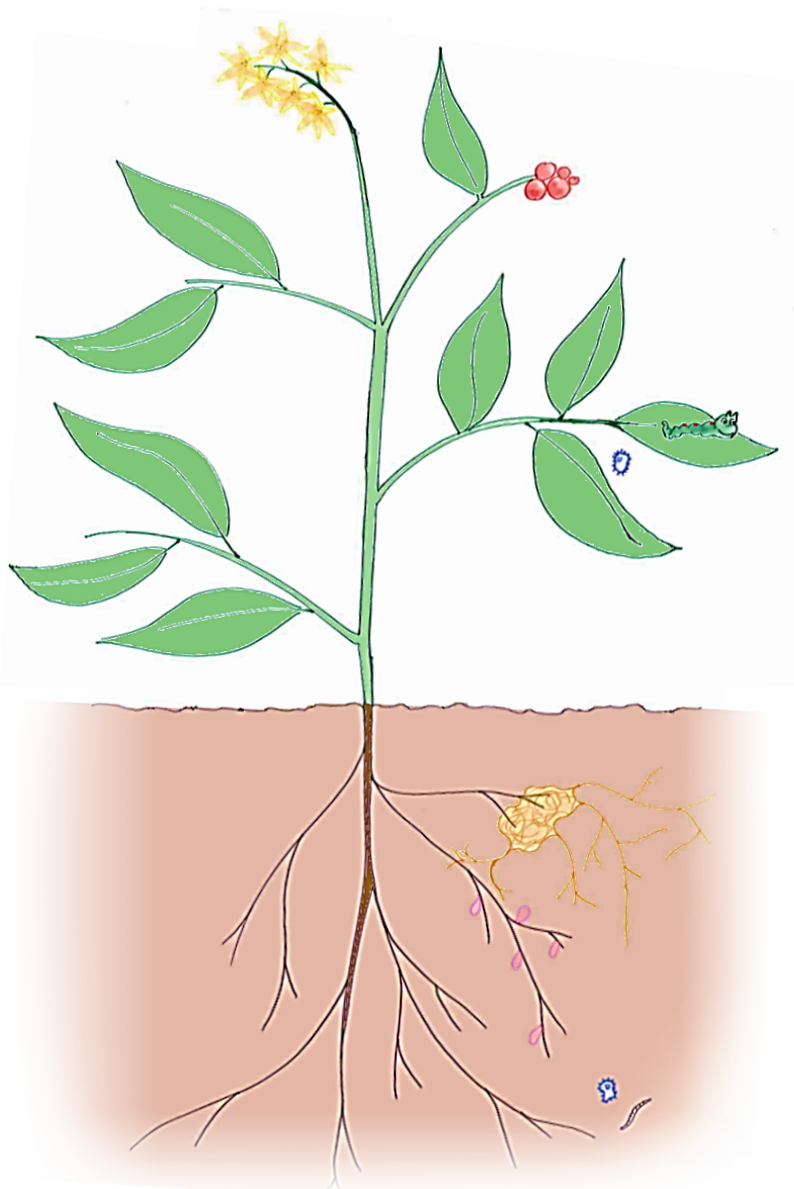
*“Biostimulants are organic materials that, when applied in small quantities, enhance plant growth and development.”*

*« Les biostimulants sont des composés organiques qui, quand ils sont appliqués en petites quantités, améliorent la croissance et le développement des plantes » (Schmidt, 2003).*

ou qu'elle les utilise mieux. Même si aucun seuil n'est défini, certains auteurs ajoutent la notion de faible quantité employée dans la définition des biostimulants (Schmidt *et al.*, 2003). Leur mode d'action et leurs effets sont variés. Ces biostimulants contiennent des molécules qui peuvent améliorer la disponibilité des nutriments déjà présents dans le sol. D'autres composés activent des voies métaboliques de la plante. Par exemple, on peut noter la présence d'hormones telles que les cytokinines dans certains biostimulants qui pourraient, pour partie, expliquer leurs effets (Zhang and Ervin, 2004). De même, Blunden *et al.* (1996) ont montré qu'un apport exogène de glycines bêtaïnes, identifiées comme présentes dans un biostimulant, avait le même effet que le biostimulant complet sur la teneur en chlorophylles chez plusieurs espèces végétales telles que la tomate, le haricot, le maïs, l'orge ou le blé. De telles identifications de composés actifs au sein d'un biostimulant font cependant exception face au grand nombre de publications décrivant les effets d'un biostimulant complet.

Il existe plusieurs types de biostimulants, dérivés d'organismes tels que des mycéliums, des bactéries, des extraits algaux ou des acides humiques. Les mycéliums et bactéries sont utilisés en tant qu'organismes. Ils sontensemencés avec la culture et permettent ainsi à l'agriculteur de modifier avantageusement la microflore tellurique. Selon les espèces, ces organismes permettent, par exemple, de fixer l'azote atmosphérique, de chélater les métaux, de contribuer directement ou indirectement à lutter contre les agents pathogènes.

Dans la suite de cette analyse bibliographique, nous nous sommes focalisés sur une autre catégorie de biostimulants, regroupant notamment les extraits algaux et



**Effets observés en réponse à l'apport de biostimulant:**

Croissance accrue  
Quantité fleurs/fruits accrue  
Meilleur rendement  
Augmentation de la photosynthèse

Résistance aux stress biotiques  
Bactéries, virus, nématodes, champignons, insectes

Résistance aux stress abiotiques:  
salinité, sécheresse, froid et gel

Favorise la croissance des microorganismes bénéfiques

Améliore la nodulation

Améliore l'absorption

Solubilise les nutriments

**Figure I.14.** Effets des biostimulants sur la croissance et la physiologie de la plante, rapportés dans la littérature. En rouge, les effets spécifiques à un apport racinaire du biostimulant. En noir, les effets communs aux apports foliaires et racinaires du biostimulants. Cadres marron: effets sur la nutrition ; cadre vert: résistances aux stress ; cadre bleu: effets sur la croissance et le rendement. Adapté de Khan, 2009.

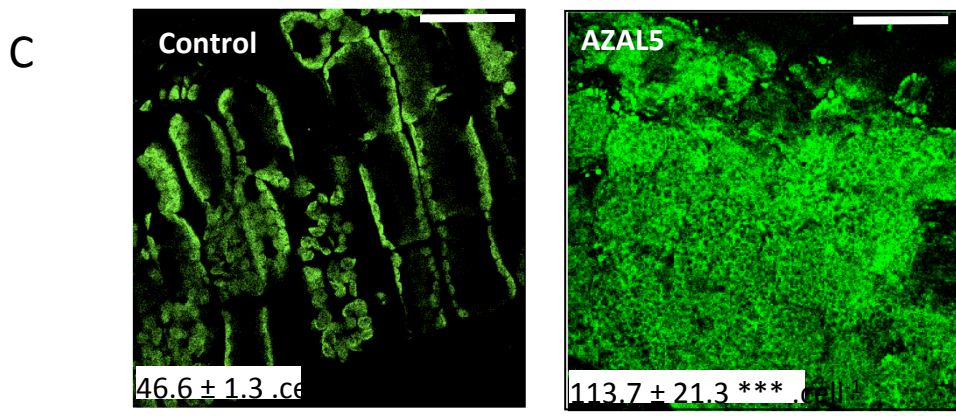
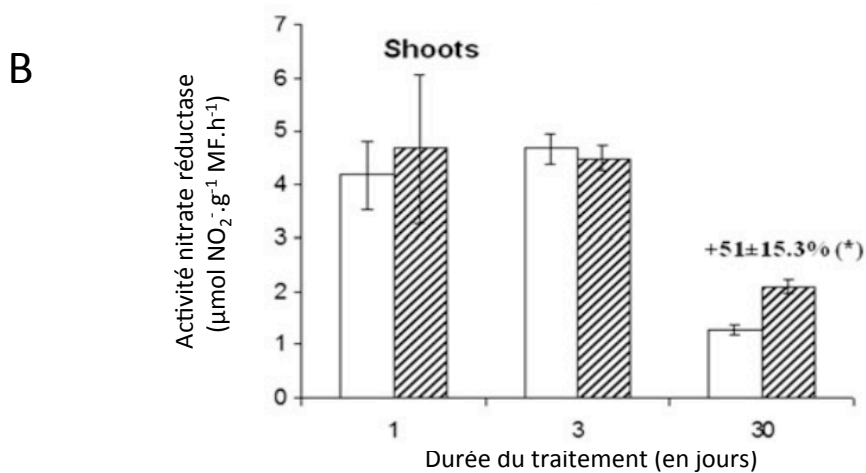
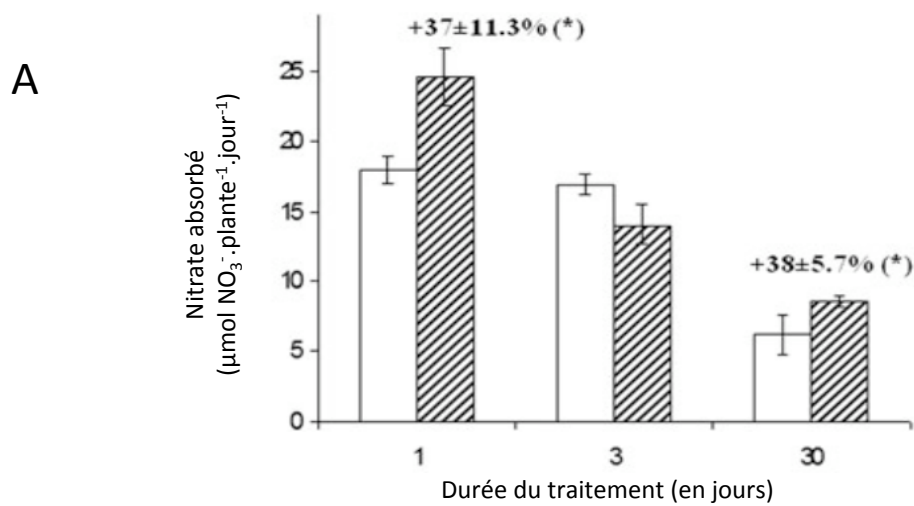


les acides humiques, qui ne sont pas (plus) des organismes vivants et qui ont subi un processus industriel avant d'être apportés au champ.

#### 3.1.2.3.2 Biostimulants d'origine algale

Depuis l'antiquité, les cultivateurs des régions côtières utilisent les algues pour amender leurs terres (Hong and Hu, 2007 ; Temple and Bomke, 1988). Aujourd'hui encore, des algues sont récoltées en mer puis épandues sur les champs à l'état brut. Une fois sèches, elles sont enfouies, puis il faut attendre plusieurs semaines de décomposition avant de procéder au semis. Cette utilisation a longtemps été très limitée géographiquement à cause de la complexité et du coût du transport de tels produits sur de longues distances. En 1857, Gardissal brevète une méthode pour compresser les algues en blocs compacts. Cependant, le produit final se révèle difficile à épandre sur les cultures. Milton en 1952, puis Hervé et Roullier en 1977, brevettent respectivement une technique d'extraction en milieu basique puis par broyage à basse température. Des extraits liquéfiés facilement transportables et épandables voient alors le jour. Par rapport aux algues fraîches, ils présentent également l'avantage de permettre un semis immédiatement après leur application.

Les extraits algaux ont été décrits pour avoir de multiples effets bénéfiques sur les plantes traitées (Figure I.14). Ainsi, des plantes traitées par des extraits algaux peuvent voir leur cycle de développement s'accélérer notamment grâce à une germination, une floraison et une fructification plus précoces (Roussos *et al.*, 2009 ; Sivasankari *et al.*, 2006). Ils peuvent également augmenter la croissance de la plante, plus spécifiquement par un développement accru du système racinaire (Rayorath *et al.*, 2008 ; Spinelli *et al.*, 2010). Par exemple, chez le colza, Jannin *et al.* (2013) ont décrit les propriétés biostimulantes d'un extrait d'algue brune *Ascophyllum nodosum*, appelé AZAL5, qui augmente la croissance foliaire de  $23\% \pm 8.6$  et double la croissance racinaire ( $+102\% \pm 13.43$ ). De plus, les extraits algaux conduisent, dans certains cas, à une amélioration du rendement des cultures (Crouch and Van Staden, 1992 ; Khan *et al.*, 2009). En outre, il a été montré que l'apport d'extraits algaux pouvait conduire à une augmentation des teneurs en chlorophylles (Mancuso *et al.*, 2006 ; Spinelli *et al.*, 2010). Par ailleurs, d'autres études ont montré que les teneurs en N, P, K, S, Mg et Zn des tissus végétaux pouvaient être significativement augmentées en réponse à un apport d'extrait algal (Jannin *et al.*, 2013 ; Mancuso *et al.*, 2006 ; Rathore *et al.*, 2009). A titre d'exemple,



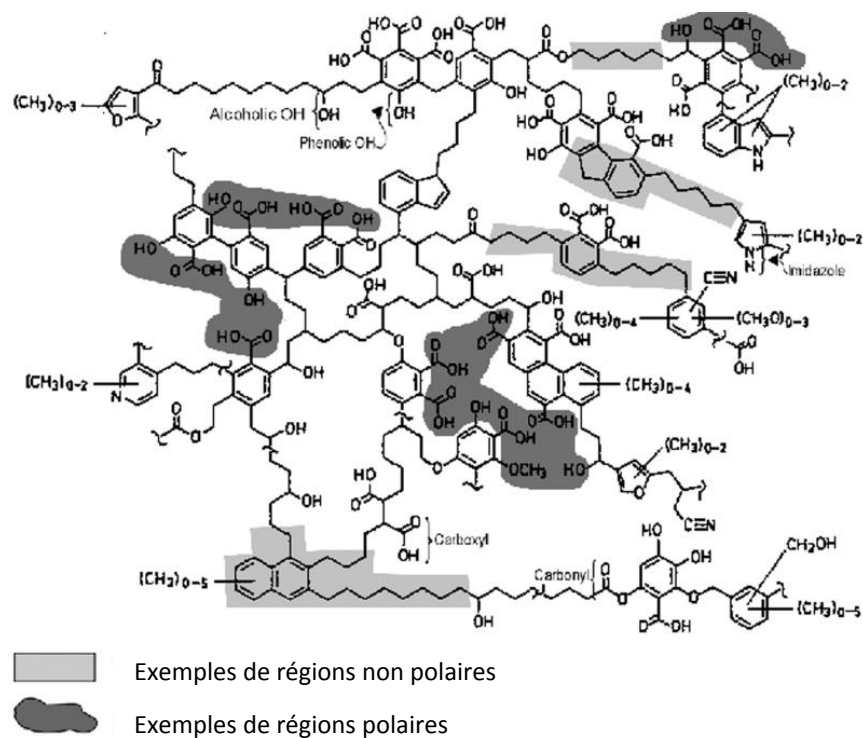
**Figure I.15.** Effet d'un apport racinaire de l'extrait algal AZAL5 chez le colza sur l'augmentation : **A)** de l'absorption de nitrate après 1, 3, et 30 jours de traitement , **B)** de l'activité nitrate réductase dans les feuilles de colza après 30 jours de traitement et **C)** du nombre de chloroplastes par cellule dans les feuilles après 30 jours de traitement. La barre blanche correspond à 2 µm. Images réalisées en microscopie confocale en utilisant la fluorescence naturelle des chlorophylles . Adapté de Jannin *et al.*, 2013.

l'étude des effets de l'extrait d'algue AZAL5 sur le colza (Figure I.15a) révèle une augmentation des quantités d'azote dans les racines (+115%) et dans les feuilles (+21%) (Jannin *et al.*, 2013). Ces auteurs ont montré que cette augmentation des teneurs en N pouvait s'expliquer notamment par une meilleure absorption de  $\text{NO}_3^-$  (+38%) *via* l'induction de transporteurs nitrate à forte affinité tels que *BnNRT1.2* (x7 après 24h de traitement) et *BnNRT1.1* (x150 après 30 jours de traitement). En outre, ces mêmes auteurs ont montré que l'augmentation des teneurs en N s'explique également par une augmentation de l'activité nitrate réductase dans les feuilles de colza traitées avec AZAL5, conduisant à une meilleure assimilation de l'azote (Figure I.15b) mais aussi à une augmentation du nombre de chloroplastes (Figure I.15c). Ainsi, l'ensemble de ces résultats montre que les extraits algaux peuvent avoir un effet bénéfique en stimulant certains processus physiologiques permettant une meilleure croissance du végétal. Il est souvent suggéré que les hormones présentes dans les extraits algaux seraient à l'origine des effets biostimulants (Khan *et al.*, 2011) Cependant, certains extraits ne contiennent pas d'hormones en quantité suffisante pour expliquer ces effets (Jannin *et al.*, 2013). Les hormones ne seraient pas les seules molécules actives à l'origine des effets bénéfiques observés et d'autres macromolécules tels que certains polysaccharides (laminarines et fucoïdanes) pourraient également en être responsables (Khan *et al.*, 2009).

Cependant, des expériences de fractionnement des extraits ont été conduites mais n'ont jusqu'alors jamais permis d'identifier une fraction de l'extrait, voir un composé précis, comme étant capable de mimer exactement l'effet de l'extrait algal natif (Beckett and Van Staden, 1989). Compte-tenu de ces résultats, il peut être suggéré que de nombreux composés très différents soient nécessaires et puissent agir en synergie.

#### 3.1.2.3.3 Acides humiques

A travers le procédé d'humification, les matières biologiques végétales se transforment en humus. Ce phénomène se déroule sous l'action de microorganismes telluriques (animaux, champignons, bactéries), leur propre dégradation s'ajoutant à celle des végétaux morts dont ils se nourrissent. L'humification a lieu dans tout sous-bois ou prairie et participe à la fixation du carbone atmosphérique dans les sols. Les acides humiques sont en général extraits de l'humus par des procédés complexes et variés, incluant des alkylations, des acidifications et/ou des processus de chauffage. En général, la matière première utilisée par les industries produisant

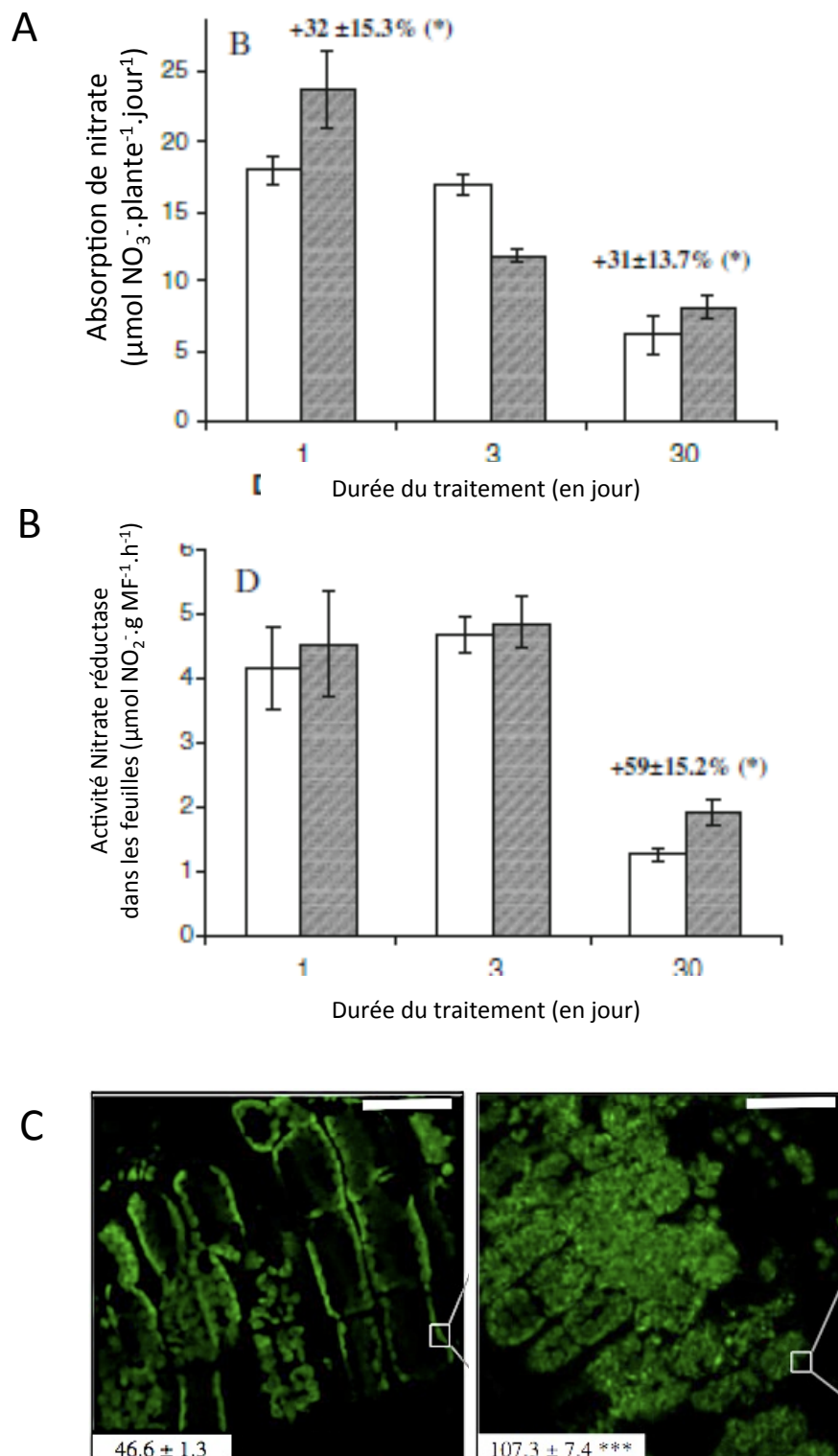


**Figure I.16.** Exemple de molécules constituant les acides humiques. Les longues chaînes carbonées sont associées à de nombreuses molécules cycliques. La structure complexe des acides humiques leur confère des régions polaires (gris foncé) et non polaires (gris clair) Cette complexité freine leur caractérisation. Adapté de Dixon *et al.*, 2002.

les acides humiques commercialisés n'est pas l'humus des sous-bois (sa qualité et sa disponibilité fluctuant énormément en fonction des saisons et des conditions climatiques), mais la tourbe provenant de gisements d'origines géographiques variées, dont la composition est plus stable (au sein d'un même gisement) et dont l'extraction est bien plus aisée. Les acides humiques sont utilisés sous forme aqueuse, généralement ajustée à 2,6% de carbone, pour être épandus sur les cultures (Jannin *et al.*, 2012). Ils contiennent des macromolécules organiques très complexes (Figure I.16), dont la caractérisation reste extrêmement difficile.

Les acides humiques peuvent avoir des effets sur le métabolisme des plantes, dont certains sont semblables aux effets précédemment décrits chez les plantes traitées avec des extraits algaux (Figures I.14, I.15 et I.17). Ainsi, les acides humiques accélèrent le cycle de développement, favorisant une fructification plus rapide (Eyheraguibel *et al.*, 2008) et augmentent la biomasse, notamment racinaire (Jannin *et al.*, 2012 ; Mora *et al.*, 2010 ; Schmidt *et al.*, 2007). A titre d'exemple, l'acide humique HA7, issu de tourbe provenant de Galicie (Espagne), accroît la biomasse des racines de colza de 88% (Jannin *et al.*, 2012). Ils peuvent également induire un rendement supérieur chez le poivre, le riz, le blé ou le colza (Arancon *et al.*, 2005 ; Keeling *et al.*, 2003 ; Tejada and Gonzalez, 2004). Les acides humiques peuvent également induire une augmentation des teneurs en chlorophylles des plantes traitées (Tejada and Gonzalez, 2004), une augmentation de l'absorption de nutriments tels que le N (Jannin *et al.*, 2012 ; Quaggiotti *et al.*, 2004) et le S (Jannin *et al.*, 2012) *via* la stimulation des mécanismes d'absorption et d'assimilation de ces deux éléments. Ainsi, l'acide humique HA7 double la quantité d'azote dans les racines (+108%) pouvant s'expliquer par une stimulation de l'absorption de nitrate (+31%, Figure I.17a) *via* l'induction de transporteurs de nitrate à haute affinité (induction du gène *BnNRT1.1* par un facteur 600 après 30 jours de traitement) et une augmentation concomitante de l'activité nitrate réductase foliaire de près de 60% (Figure I.17b). De même, une augmentation du nombre de chloroplastes dans les feuilles de plantes traitées a été rapportée (Figure I.17c).

Deux grandes hypothèses ont été émises pour expliquer leurs effets bénéfiques sur les plantes. La première hypothèse consiste à penser qu'ils peuvent agir directement sur les différentes propriétés physico-chimiques du sol. Ainsi, il a été démontré qu'ils favorisaient le maintien du sol en gros agrégats, empêchant ainsi l'érosion et par la même occasion, la perte de nutriments (Piccolo *et al.*, 1997). Par



**Figure I.17.** Effets de l'apport racinaire de l'acide humique HA7 chez le colza sur l'augmentation : **A)** de l'absorption du nitrate après 1, 3 et 30 jours de traitement, **B)** de l'activité nitrate réductase dans les feuilles après 30j de traitement et **C)** du nombre de chloroplastes par cellule dans les feuilles après 30 j de traitement. La barre blanche correspond à 2 µm. Images réalisées en microscopie confocale en utilisant la fluorescence naturelle des chlorophylles. Adapté de Jannin *et al.*, 2012.

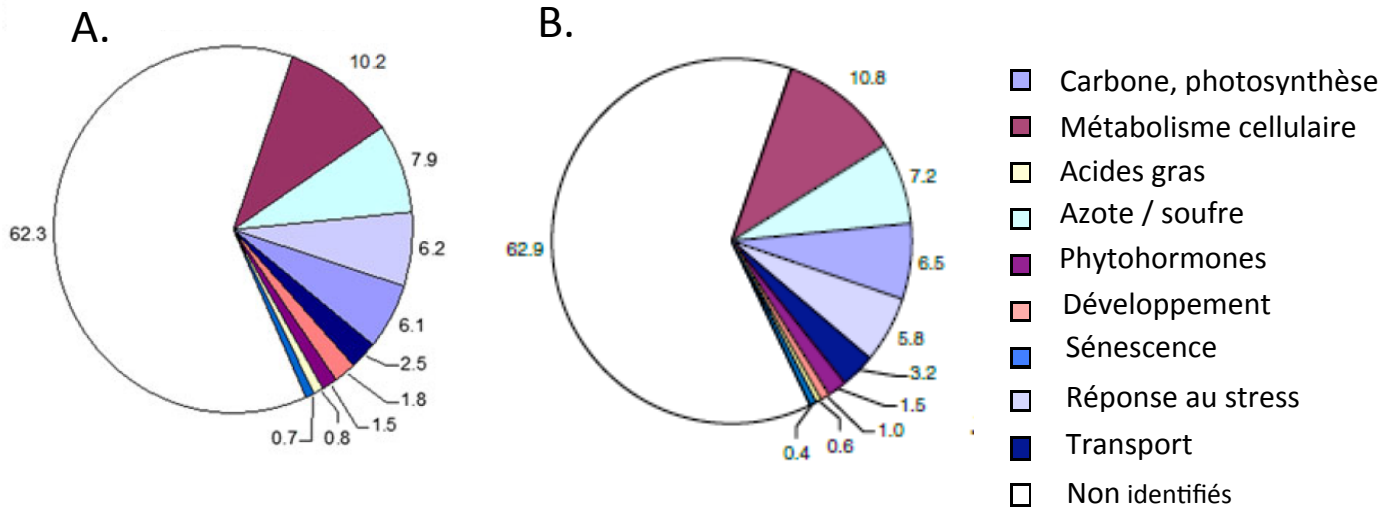
ailleurs, d'autres études ont permis de montrer que les acides humiques auraient la capacité de chélater certains éléments tels que Cu, Zn et Fe, favorisant ainsi leur absorption par la plante (Garcia-Mina, 2006). Enfin, ils peuvent impacter la communauté microbienne, qui à son tour peut modifier les caractéristiques du sol et augmenter la phytodisponibilité de minéraux (Puglisi *et al.*, 2009). La seconde hypothèse, défendue par certains auteurs, consiste au contraire, à penser que l'action des acides humiques au niveau du sol serait modique et qu'ils auraient une action directe sur la plante en stimulant certaines voies métaboliques telles que, par exemple, les mécanismes d'absorption et d'assimilation de l'azote (Jannin *et al.*, 2012).

Les molécules effectrices des extraits humiques ne sont pas connues avec certitude. La plupart des auteurs avance l'hypothèse que des hormones végétales, telle que l'auxine, présentes dans les extraits seraient responsables des effets bénéfiques (Muscolo *et al.*, 2007). Les composés de faible masse moléculaire sont également généralement cités (Quaggiotti *et al.*, 2004). Cependant, comme pour les extraits algaux, il est très difficile de démontrer l'effet bénéfique d'un composé particulier. Ainsi, l'effet bénéfique des acides humiques serait, lui aussi, dû à une synergie de plusieurs composés entrant dans leur composition.

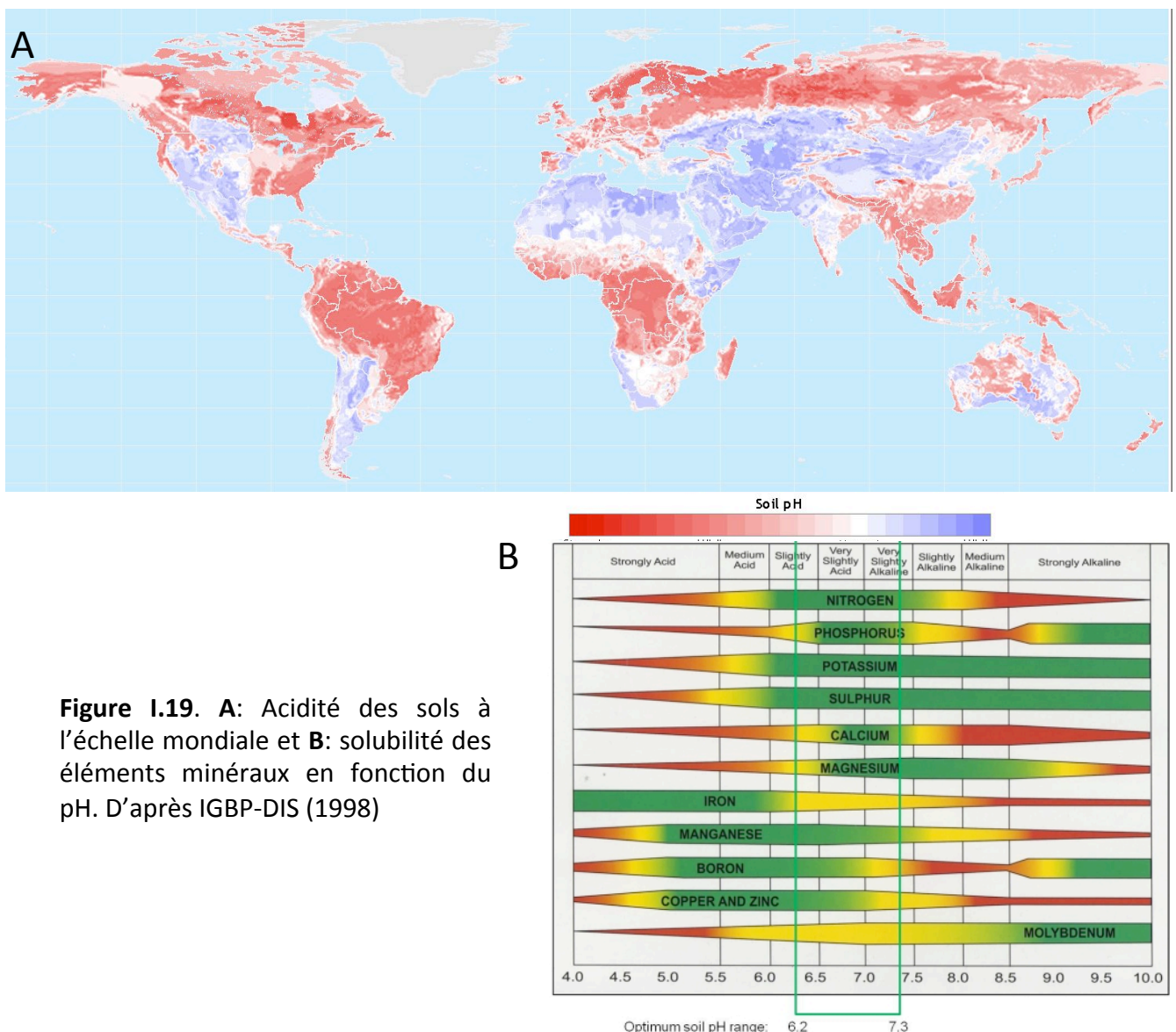
### 3.2 Identification de biostimulants efficaces

L'efficacité des biostimulants dépend d'une part, de la qualité des matériaux bruts utilisés et d'autre part, des processus de fabrication permettant d'obtenir la forme finale qui sera apportée aux végétaux. Une fois obtenu, le biostimulant doit être testé en présence de la plante afin d'évaluer ses effets bénéfiques sur la croissance et le développement du végétal. Ces extraits ont également l'inconvénient d'avoir un spectre d'efficacité assez limité. Généralement décrits sur une espèce donnée, leurs effets sont rarement reproductibles avec la même intensité sur d'autres espèces cultivées. Leurs effets peuvent également fluctuer en fonction du sol ou des autres paramètres de cultures.

Par exemple, au cours de son travail doctoral, L. Jannin a testé les effets de 13 extraits (humiques et algaux) sur la croissance et la nutrition azotée du colza. Cette étude lui a permis d'identifier deux extraits, l'extrait algal AZAL5 et l'acide humique HA7 ayant un effet bénéfique sur la croissance et les nutriments N et S du colza (voir précédemment). Par ailleurs, *via* des approches de transcriptomique de



**Figure I.18.** Analyses transcriptomiques de feuilles de colza traitées par un apport racinaire de l'extrait algal AZAL5 (A) ou par l'extrait humique HA7 (B). Les chiffres indiquent le pourcentage de gènes différentiellement exprimés dans les feuilles entre les plantes témoins et les plantes traitées et leur classification métabolique. Données extraites de Jannin *et al.*, 2012 et 2013.



**Figure I.19.** A: Acidité des sols à l'échelle mondiale et B: solubilité des éléments minéraux en fonction du pH. D'après IGBP-DIS (1998)



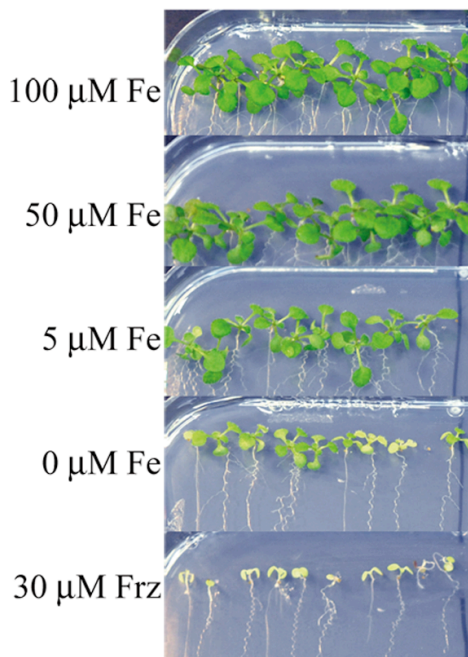
masse faisant appel à des Microarrays (puce à ADN), Jannin *et al.* (2012 ; 2013) ont montré que ces extraits modifiaient considérablement le transcriptome de la plante, avec un impact notamment sur les gènes impliqués dans la réponse aux stress (respectivement 6% et 5.8% des gènes différentiellement exprimés par AZAL5 et HA7, Figures I.18), ainsi que les gènes codant des enzymes impliquées dans les métabolismes du soufre et de l'azote (respectivement 7% et 7,2% des gènes différentiellement exprimés par AZAL5 et HA7), mais également dans de nombreux autres processus. Ainsi, si l'effet bénéfique de ces biostimulants (AZAL5 et HA7) sur les métabolismes des macroéléments tels que N et S est relativement clair et avéré, il peut être suggéré que ces extraits puissent avoir également des effets bénéfiques sur la gestion d'autres éléments minéraux importants dans un contexte de biofortification et non analysés au cours de ces travaux tels que le Fe, le Mg, le Cu et le Zn.

### 3.3 Les nutriments cibles de la biofortification : rôles et transport chez les végétaux

Que ce soit dans une optique de biofortification par sélection variétale ou par apport de biostimulant, l'approfondissement des connaissances sur la fonction et la gestion des nutriments tels que Fe, Mg, Zn et Cu chez les plantes est impératif. Les parties qui suivent présentent les connaissances actuelles relatives à ces quatre éléments minéraux. Pour chaque élément, une présentation non exhaustive des protéines impliquées dans son absorption et son transport sera présentée progressivement.

#### 3.3.1 Le Fer (Fe)

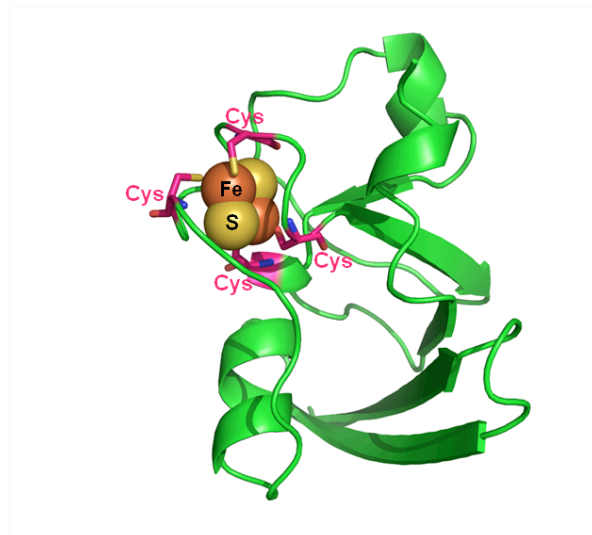
Les plantes peuvent être carencées en Fe lorsqu'elles sont cultivées sur des sols déficients ou sur des sols calcaires qui limitent l'absorption (Alloway, 2004). Les sols calcaires représentent 30% des sols arables et ont des pH alcalins (Figure I.19). Or, à des pH supérieurs à 6-7, le fer soluble  $Fe^{3+}$  devient de l'hydroxyde de Fe (III)  $Fe(OH)_3$ , qui précipite avec des ions inorganiques et n'est plus assimilable par la plante (Hell and Stephan, 2003). La disponibilité du fer est aussi réduite par de fortes concentrations en phosphore (P), en  $NO_3^-$  et par la présence d'agents pathogènes racinaires (Alloway, 2013). Lorsque les plantes sont carencées en Fe, des symptômes de chlorose inter-nervaires apparaissent. Si la carence se prolonge, elle se traduit par des pertes importantes de biomasse et de rendement (Figures I.20 et I.21).



**Figure I.20.** Effet d'une déficience en Fe sur *Arabidopsis thaliana* cultivée en boîte de Pétri sur ½ MS. A gauche sont indiquées les concentrations en Fe (apporté sous forme de Fe-EDTA). Frz: Ferrozine, un puissant chélateur diminuant fortement la disponibilité en Fe. Sivitz *et al.*, 2012.



**Figure I.21.** Champ de soja avec une déficience en Fe localisée (cercle bleu). Image NutechSeed.



**Figure I.22.** Structure d'une ferredoxine à centre [2Fe-2S]. En vert, la structure tertiaire (ou secondaire) avec feuillettes (flèche) et hélices, en rose les quatre cystéines assurant la liaison avec le centre [2Fe-2S]. En orange les atomes de Fe et en jaune les atomes. D'après EBI, 2014.

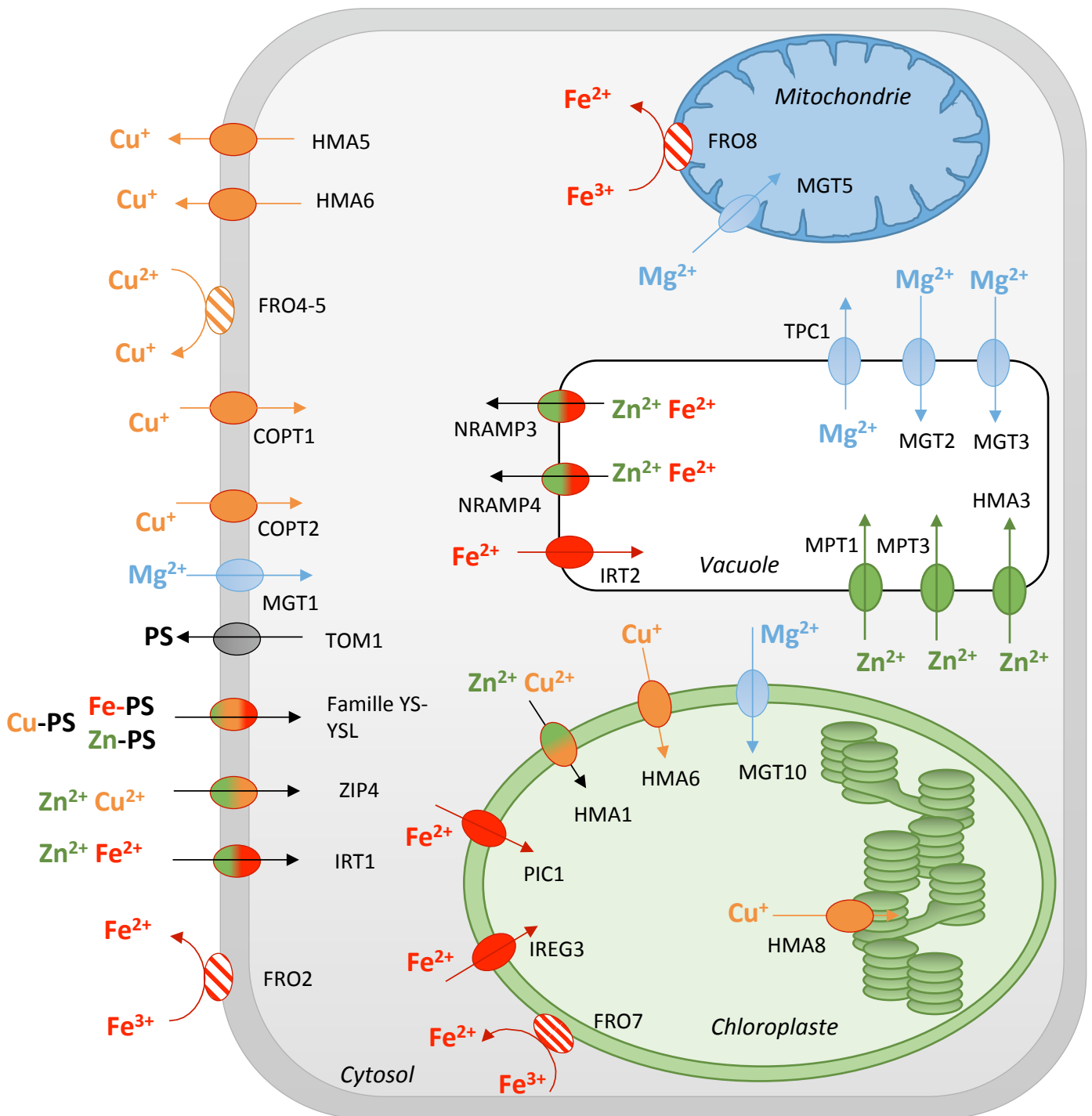
### 3.3.1.1 Fonctions du fer chez les végétaux

Le Fer est un métal de transition, pouvant passer d'une forme réduite  $\text{Fe}^{2+}$  à une forme oxydée  $\text{Fe}^{3+}$ . Au niveau cellulaire, cette capacité à facilement accepter ou donner un électron le place au centre de nombreuses réactions d'oxydo-réduction, en particulier dans les mécanismes liés à la photosynthèse. Ainsi, 80% du fer intracellulaire est localisé dans les chloroplastes (Briat and Vert, 2004). A titre d'exemple, les différents constituants de l'appareil photosynthétique requièrent au total 21 atomes de fer. Le fer a également un rôle prépondérant dans la mitochondrie, mais également dans la détoxification des radicaux libres (Naik, 1984) et la fixation symbiotique de l'azote chez les légumineuses (O'hara *et al.*, 1988). Chez *Arabidopsis thaliana*, une approche bioinformatique a permis de montrer que sur les 27 243 protéines de cette plante, 81 contenaient ou liaient un ou plusieurs atomes de Fe. Ces atomes sont inclus dans les enzymes sous différentes formes dont les deux principales sont les centres fer-soufre (Fe-S,) et les noyaux hèmes.

Les centres Fe-S sont les plus répandus et en leur sein, on trouve généralement 2 ou 4 atomes de fer associés à 2 ou 4 atomes de soufre qui forment ainsi les complexes  $[2\text{Fe}-2\text{S}]$  et  $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ . Dans ces complexes, le Fe joue un rôle central puisque la capacité d'oxydo-réduction de ces centres est assujettie à la variance de la valence des atomes de Fe. Les protéines à centre Fe-S telles que les ferredoxines (Figure I.22) sont prépondérantes dans les processus de transfert d'électrons dans les membranes mitochondriales et chloroplastiques.

Les groupements hème et hémine sont constitués d'un atome de Fe (respectivement  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$ ) enchâssé dans un noyau tétrapyrrolique en se liant à 4 atomes d'azote. L'hème est généralement lié de manière non covalente à l'hémoprotéine. Les cytochromes, impliqués dans la photosynthèse et la respiration ainsi que la nitrate réductase sont les principales hémoprotéines des plantes.

Pour les autres protéines à fer, la liaison entre l'atome de fer et la protéine se fait sans structure particulière. A titre d'exemple, la ferritine, protéine très abondante chez les végétaux, a pour rôle de stocker le Fe sous une forme non toxique pour la cellule. En effet, à cause de sa forte capacité d'oxydoréduction qui peut rapidement induire une toxicité, la teneur en Fe libre dans la cellule doit être finement contrôlée (Briat and Vert, 2004).



**Figure I.23.** Principaux transporteurs de Fer (rouge), de Mg (bleu), de Zn (vert) et de Cu (orange) identifiés et localisés à ce jour dans une cellule végétale. Certains transporteurs aspécifiques sont capables de transporter plusieurs éléments. Dans ce cas, il apparaissent avec un mélange de couleurs correspondant aux éléments transportés. Pour chaque transporteur, les flèches droites indiquent le sens de transport de l'élément (influx ou efflux). Pour être pris en charge par leur transporteurs, le Cu et le Fe doivent être préalablement oxydés par des oxydases indiquées en hachures. PS : Phytosidérophores. Adapté de Barnal, (2007), Yruela (2009), Puig et Peñarrubia (2009) et Waters (2011).

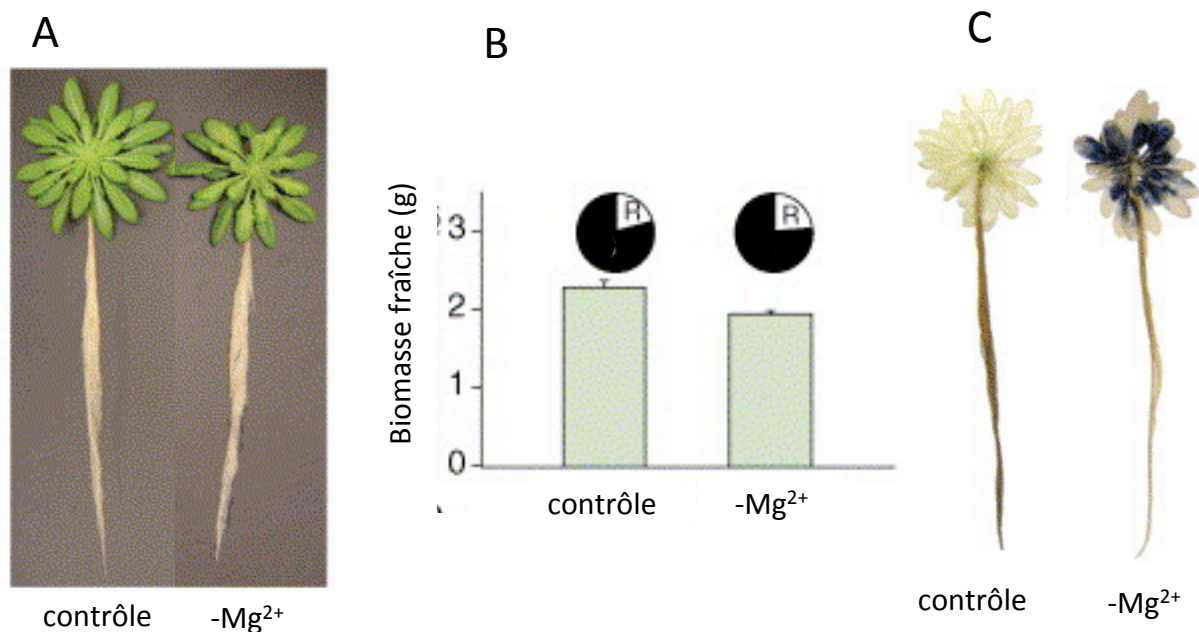
### 3.3.1.2 Absorption et transport du Fe chez les végétaux.

Quatre familles de transporteurs de fer (Figure I.23) ont été identifiées chez les plantes : NRAMP (natural resistance-associated macrophage protein), ZIP (Zinc Iron regulated transport comprenant IRT1 (IronRegulated Transporter)), IREG (Iron Regulated) et YS-YSL (Yellow Strip-YS-like). Cette dernière famille est la seule à transporter le Fer sous sa forme  $Fe^{3+}$  (voir ci-dessous).

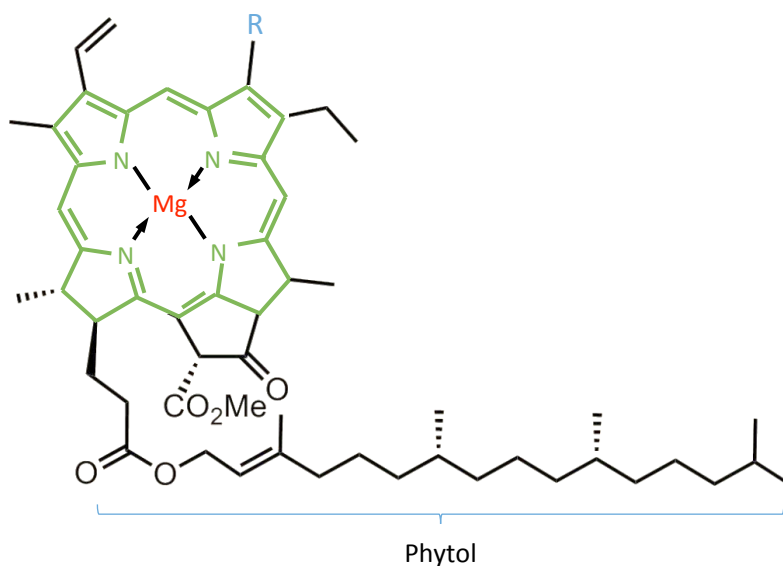
Le Fe est présent dans le sol sous la forme  $Fe^{3+}$ . Deux stratégies d'absorption sont décrites chez les plantes. La première fait intervenir IRT1 qui est le principal transporteur de fer impliqué dans l'absorption, mais ne transporte que le  $Fe^{2+}$ . La machinerie d'absorption du Fe est constituée ainsi du transporteur racinaire (IRT1) et d'une réductase (FRO2) qui réduit préalablement  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  avant qu'il ne soit pris en charge par IRT1 (Figure I.23). La seconde stratégie est présente chez les herbacées et requiert la sécrétion par le végétal, *via* le transporteur racinaire TOM, de chélateurs de Fe tels que les phytosydérophores (PS). Le complexe Fe-phytosydérophore est ensuite absorbé par des transporteurs racinaires de type YS-YSL (Thomine and Vert, 2013).

Du fait de la faible mobilité du Fe dans le sol, une des principales stratégies de la plante en situation de déficience en Fe consiste à maximiser l'exploration du milieu en stimulant sa croissance racinaire. La plante peut également sécréter des enzymes capables de dégrader des composés organiques séquestrant le Fe, ou des acides organiques qui permettent d'acidifier le sol et de rendre ainsi le Fe plus disponible (White and Broadley, 2009).

A cause de sa toxicité, le transport et le stockage du Fe ne peut se faire sous forme libre. Ainsi, le stockage du Fe est majoritairement plastidiale, où il est stabilisé par la ferritine. Le transport du  $Fe^{2+}$  vers le chloroplaste serait assuré par PIC1 ou IREG3 après réduction du  $Fe^{3+}$  par FRO7 (figure I.23). En situation de suraccumulation, le Fe peut également être stocké dans les vacuoles après un transport assuré par IRT2, NRAMP3 ou NRAMP4 (Figure I.23) où il sera complexé à d'autres molécules telles que le malate (Fe-Malate), le citrate (Fe-Citrate) ou encore la nicotianamine (Fe-NA). Lors de son transport dans les sèves, le Fe est obligatoirement complexé aux acides organiques ou à la NA pour éviter toute toxicité. Cette forme NA-Fe serait également transportée par des transporteurs de la famille YS-YSL lors de la redistribution du Fe entre les organes.



**Figure 1.24.** Comparaison de deux cultures hydroponique d'*Arabidopsis thaliana* cultivés en présence de Mg (contrôle, 1mM MgSO<sub>4</sub>) ou en absence de Mg (-Mg<sup>2+</sup>). **A:** Phénotype des plante obtenu après 162 jours de cultures hydroponiques puis 12j en présence de Mg (contrôle) ou en absence de Mg (-Mg). **B:** Biomasse fraîche totale des plantes contrôles et carencées. Les diagrammes circulaires représentent la proportion racine (diagramme circulaire blanc)/partie aérienne (diagramme circulaire noir). **C:** Photographie des plantes contrôles et carencée en Mg après coloration à l'iode pour révéler la présence d'amidon (c). Adapté de Hermans *et al.*, 2006.



**Figure 1.25.** Structure des chlorophylles. Chlorophylle a: R=CH<sub>3</sub> ; Chlorophylle b: R=CHOH. En rouge : atome de Mg enchâssé dans le noyau porphyrine (vert). Phytol: alcool terpenoïde à 20 atomes de carbone. Cambell and Reece, 2006.

### 3.3.2 Le magnésium (Mg)

Le magnésium est l'un des cations les plus abondants sur Terre. Il est le quatrième chez les êtres vivants (après Ca, K et Na), le deuxième dans l'hydrosphère (après K et à égalité avec Ca) et le sixième dans la lithosphère (après O, Si, Al, Fe et Ca) (Wolf and Cittadini, 2003). En dépit de ses rôles majeurs dans le fonctionnement du végétal, la gestion du Mg dans l'agriculture est très peu prise en compte, conduisant à des phénomènes de carences chez certaines plantes cultivées (Cakmak and Yazici, 2010). Cette déficience peut être due à une faible proportion de Mg dans le sol, à une trop forte présence de K ou de Ca (Walsh and O'Donohoe, 1945) et peut également apparaître sur des sols riches en Mn, en particulier s'ils sont acides (Mayland and Wilkinson, 1989). Une déficience en Mg induit pourtant de graves dommages aux cultures, tels qu'une réduction du système racinaire et une chlorose inter-nervaire des feuilles âgées (Figure I.24a, b), Cakmak et Marschner, 1992 ; Cakmak *et al.*, 1994) conduisant à une perte de croissance, et *in fine*, de rendement. Néanmoins, ces symptômes visuels n'apparaissent que tardivement en situation de carence en Mg. Au niveau physiologique, des perturbations métaboliques précoces telles qu'une déstabilisation du transport des sucres conduisant notamment à une accumulation de sucrose dans les jeunes feuilles ont par ailleurs été mises en évidence en réponse à une carence en Mg (Figure I.24c) (Hermans and Verbruggen, 2005).

*Magnesium: A Forgotten Element in Crop Production.*

*Magnésium: un élément oublié dans la culture céréalière. Titre de publication, Cakmak, 2010.*

#### 3.3.2.1 Fonctions du Mg chez les végétaux

L'ion  $Mg^{2+}$  est un élément particulier de par ses propriétés physiques : parmi tous les cations, il possède à la fois le rayon ionique le plus petit (0.86 Å) et le rayon hydraté le plus grand (Hattori *et al.*, 2007). Ces propriétés physico-chimiques lui confèrent un rôle majeur dans les cellules végétales et le rendent irremplaçable dans bon nombre de processus biologiques. Premièrement, lors de la photosynthèse, il contrebalance la forte différence de charge induite par l'export de protons hors des thylakoïdes vers le stroma. Ce contrôle de charge existe aussi dans les vacuoles où il neutralise les anions tels que  $Cl^-$ . Le  $Mg^{2+}$  libre peut ainsi représenter de 60% à 90% du Mg des tissus (Fink and Tabingen, 1992). De plus, un atome de Mg est au centre

Nomenclature MGT	Nomenclature MRS2
MGT1	MRS2-10
MGT2	MRS2-1
MGT3	MRS2-5
MGT4	MRS2-3
MGT5	MRS2-6
MGT6	MRS2-4
MGT7	MRS2-7
MGT9	MRS2-2
MGT10	MRS2-11

**Figure I.26.** Correspondance des nomenclatures MGT et MRS2 des transporteurs de Mg à haute affinité. MGT8-MRS2-8 et MRS2-9 n'existent pas, les séquences correspondantes se sont révélées coder des pseudo-gènes (adapté de Waters, 2011)



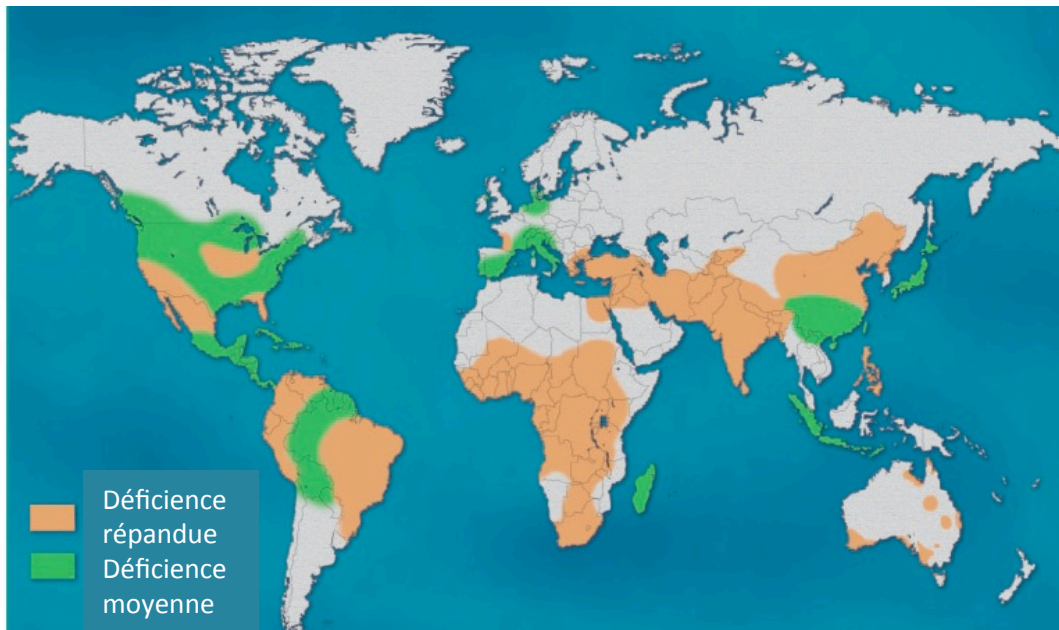
du noyau porphyrine de la chlorophylle et ainsi un élément clé dans le processus de photosynthèse (Figure I.25). Cette seule fonction requiert 20% du magnésium des feuilles (White and Broadley, 2009).

Le Mg est également indispensable au bon fonctionnement de certaines enzymes telles que la Malate déshydrogénase, composant essentiel du cycle de l'acide citrique qui fournit l'essentiel de l'énergie aux cellules, ou à la RuBisCO, l'enzyme centrale de la photosynthèse. De plus, de nombreuses réactions consommatrices d'ATP utilisent l'ATP principalement sous une forme complexée à un ion  $Mg^{2+}$ , dite ATP-Mg. Par ailleurs, le Mg est également capable de se lier aux acides nucléiques chargés négativement et participe ainsi à la stabilisation des ARN ou ADN.

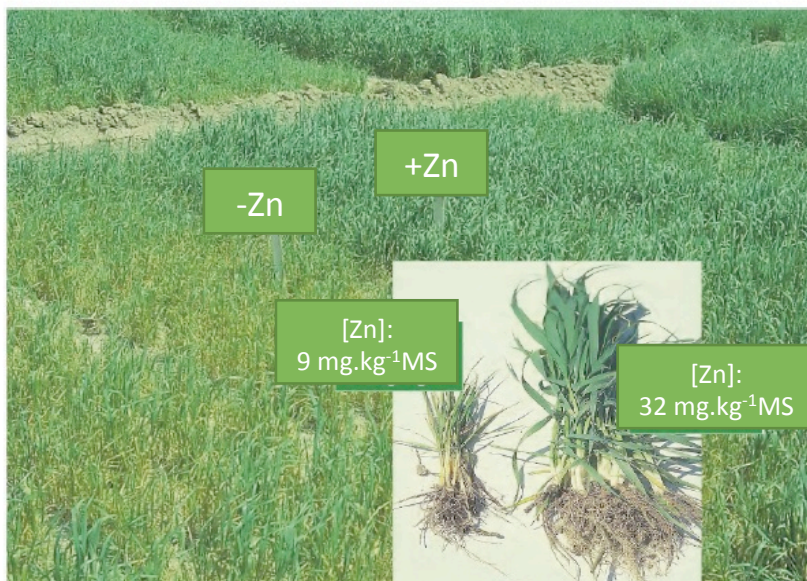
En réponse à des déficiences légères en Mg, l'ion  $Mg^{2+}$  peut être remplacé par un ion manganèse  $Mn^{2+}$  au niveau de certaines enzymes. Il en résulte généralement une baisse de l'activité enzymatique (Lovitt *et al.*, 2010). Ce remplacement ne peut donc pas pallier à une carence trop importante en Mg.

#### 3.3.2.2 Absorption et transport du Mg chez les végétaux

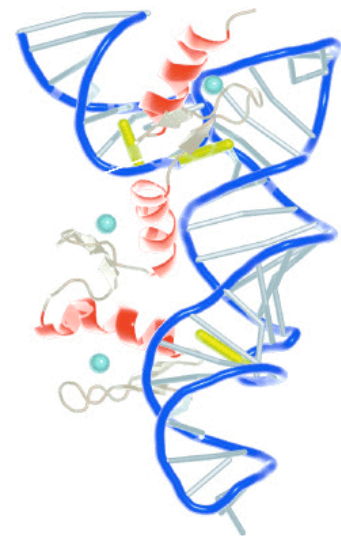
Le magnésium est absorbé au niveau racinaire sous forme  $Mg^{2+}$  par des mécanismes relativement peu connus. Pour certains auteurs, l'absorption se ferait par des canaux à cations non spécifiques (White and Broadley, 2009) et serait favorisée par les transporteurs de la famille MGT codés par 10 gènes différents identifiés chez *Arabidopsis thaliana* (Waters, 2011). Pour ces transporteurs, deux nomenclatures ont été décrites simultanément (Figure I.26, Li *et al.*, 2001; Schock *et al.*, 2000). Pour des raisons de simplification, seule la nomenclature MGT a été utilisée par la suite. MGT1, le premier transporteur à haute affinité pour le Mg identifié chez *Arabidopsis thaliana* (Li *et al.*, 2001) et localisé au niveau de la membrane plasmique (Figure I.21), serait responsable de l'essentiel de l'absorption de  $Mg^{2+}$ . MGT7 est un autre transporteur qui serait localisé au niveau du système endomembranaire des cellules racinaires et qui serait également impliqué dans l'absorption du  $Mg^{2+}$  (Gebert *et al.*, 2009). Concernant les autres transporteurs de la famille des MGT (Figure I.23), MGT10 est exprimé dans la membrane plastidiale (Drummond *et al.*, 2006), alors que MGT2 et MGT3 sont exprimés dans le tonoplaste et seraient impliqués dans le stockage vacuolaire de  $Mg^{2+}$  (Conn *et al.*,



**Figure I.26.** Prévalence des déficiences en Zn dans les cultures au niveau mondial. Adapté de Alloway, 2004.



**Figure I.27.** Cultures de blé sur sol calcaire déficient en Zn (-Zn:  $0,1\text{mg.kg}^{-1}$ ) dans la province d'Eskisehir (Turquie), avec (+Zn,  $50\text{kg ZnSO}_4\cdot\text{ha}^{-1}$ ) ou sans apport de Zn. En médaillon: détail des plantes et teneurs en Zn dans les feuilles de plantes cultivées sur le sol déficient en Zn (à gauche) et de plantes cultivées sur le sol fertilisé en Zn (à droite). Adapté de Cakmak, 2008.



**Figure I.28.** Structure d'une protéine à trois doigt de zinc se liant à une boucle d'ARN double brin (bleu foncé). Les atomes de Zn sont représentés en bleu clair. Chaque atome de Zn assure la conformation d'un motif appelé «doigt de zinc», permettant une liaison spécifique. Stefl *et al.*, 2005.

2011). Enfin, MGT5 serait impliqué dans l'influx de Mg dans la mitochondrie (Li *et al.*, 2008). De manière surprenante, contrairement aux autres types de carences, une carence en Mg n'induit pas de surexpression des gènes codant des transporteurs de  $Mg^{2+}$  à hautes affinités tels que ceux de la famille MGT (Hermans *et al.*, 2010). De plus, des expériences de mutagenèse dirigée contre les gènes codant les transporteurs MGT et en particulier MGT1, MGT2 et MGT3, montrent que les mutants déficients ne présentent aucun phénotype particulier par rapport aux plantes sauvages (Gebert *et al.*, 2009). Ainsi, les auteurs suggèrent que chez ces mutants, les autres transporteurs de la famille MGT (voire d'autres familles à ce jour non identifiées) pourraient assurer une compensation. De même, les stratégies de réponses visant à améliorer l'absorption ou l'utilisation du Mg en cas de carence en Mg sont actuellement mal connues.

### 3.3.3 Le Zinc (Zn)

La déficience en Zn dans les cultures est de loin la déficience la plus ubiquiste. Par exemple, et comme l'illustre la figure I.26, un tiers des sols exploités en Chine, la moitié en Turquie (Figure I.27) et en Inde, ainsi que la plupart des sols australiens souffrent d'un manque de phytodisponibilité en Zn (Alloway, 2004 ; White and Broadley, 2009). Cette déficience touche toutes les espèces cultivées, mais certaines y sont plus sensibles, notamment le maïs, le haricot ou le coton. De même, on estime que 50% du riz de bas-fond est carencé en Zn (Scharpenseel *et al.*, 1983). Comme pour le fer, l'absorption du zinc est limitée sur des sols calcaires ou alcalins (Figure I.19), mais également en présence de fortes concentrations en Mg,  $HCO_3$ , NaCl, Cu ou P (Alloway, 2013). Le coefficient de diffusion de  $Zn^{2+}$  dans le sol étant relativement faible, la principale stratégie des plantes face à la déficience en Zn consiste à accroître l'extension de leur système racinaire (Hacisalihoglu and Kochian, 2003). En outre, en sécrétant des acides organiques, la plante peut augmenter la solubilité du Zn dans le sol et ainsi favoriser son absorption (White and Broadley, 2005).

#### 3.3.3.1 Fonctions du Zn chez les végétaux

Le zinc a la particularité de former des structures tétraédriques très stables avec plusieurs autres éléments tels que N, C et S (Yruela, 2013). De cette manière, le Zn permet de structurer une protéine, et en particulier de permettre une bonne conformation du site réactionnel des enzymes. Le Zn est ainsi un élément primordial à l'établissement d'interactions protéines-acides nucléiques très spécifiques d'une

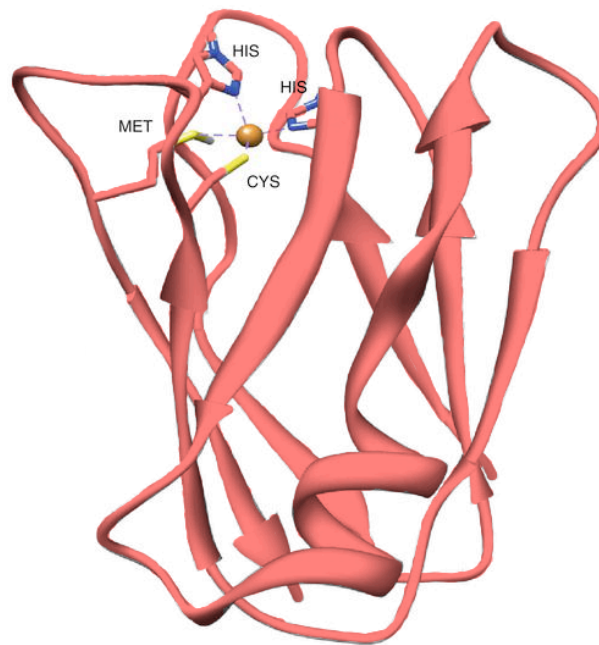


séquence, *via* des structures appelées « doigts de zinc » (Figure I.28). Ces structures sont présentes dans de nombreux facteurs de transcription agissant sur la régulation transcriptionnelle de nombreuses voies métaboliques. En effet, la structure « doigt de zinc » permet une reconnaissance fidèle de certains codons, permettant une liaison spécifique des protéines à doigts de zinc à des séquences particulière des promoteurs.

Sur les 27 243 protéines identifiées chez *Arabidopsis thaliana*, des approches de bioinformatique ont permis de révéler que 536 protéines contiennent ou sont capables de se lier à un ou plusieurs atomes de Zn (Gladyshev *et al.*, 2004). Six de ces protéines utilisent 10% du Zn cellulaire. La première est une ARN polymérase exprimée à environ 5000 copies par cellule et liant un atome de zinc ; les cinq autres sont des ARNt synthases exprimées chacune à 2000-3000 copies par cellule et nécessitant deux atomes de zinc par copie (Broadley *et al.*, 2007). Le zinc est notamment au cœur de sites enzymatiques de protéines impliquées dans la détoxification de radicaux libres, telles que la Zn-Cu Superoxyde Dismutase (Zn-Cu SOD). Par ailleurs, des travaux ont également montré que le Zn est un élément essentiel au bon fonctionnement de certaines enzymes du cycle de Krebs (la succinate DH, la sérine acétyl-transférase ou la citrate synthase) ou encore des ATP synthases. Ce grand nombre de protéines Zn-dépendantes fait que la concentration cytoplasmique de Zn libre est extrêmement faible (Broadley *et al.*, 2007).

#### 3.3.3.2 Absorption et transport du Zn chez les végétaux

Comme pour le Fe, le transporteur majoritairement responsable de l'absorption de Zn (Figure I.23) est IRT1 (Olsen and Palmgren, 2014). D'autres transporteurs de la famille ZIP sont présents dans les racines (HvZIP7 chez l'orge par exemple), mais seraient plus particulièrement impliqués dans la translocation du Zn des racines vers les parties aériennes et non dans l'absorption de cet élément. Les transporteurs HMA3, AtMTP1 et AtMTP3 (Metal Tolerance Protein) sont impliqués dans le transport tonoplastique et donc dans le stockage vacuolaire du Zn. Les transporteurs de la famille HMA sont des pompes ATPases, qui permettent de transporter le Zn contre un potentiel énergétique défavorable. Ainsi, AtHMA1 permet le transport de Zn à travers la membrane chloroplastique (Figure I.23). Le Zn peut également être chélaté par la nicotianamine et dans ce cas, comme pour le Fe, il est alors pris en charge par les transporteurs de la famille YS-YSL.



**Figure 1.29.** Structure de la plastocyanine au sein de laquelle l'atome de Cu est indiqué en orange. En rose la structure tertiaire avec feuillets (flèches) et hélices. Les acides aminés impliqués dans les interactions avec l'atome de Cu sont indiqués (His: Histidine, Met: methionine, Cys : Cystéine). Adapté de Bertini et Pierattelli, 2013.

### 3.3.4 Le Cuivre (Cu)

La déficience en cuivre touche des cultures telles que le blé, l'orge, la luzerne et le colza. En Europe, on estime par exemple que 30% des terres cultivées écossaises sont déficientes en Cu et 25% en Allemagne et au Danemark (Sinclair and Edwards, 2008). Une déficience peut également apparaître en cas de trop forte fertilisation en P et N, mais aussi de certains nutriments tels que Zn, Fe ou Mn (Alloway, 2013). Chez les céréales, cette déficience provoque une stérilité des organes mâles et peut amener à une réduction du rendement allant jusqu'à 20%, sans pour autant présenter les symptômes avant-coureurs visibles (Graham and Nambiar, 1981), que sont le mélanisme, le blanchissement des extrémités et le dessèchement, généralement observés en réponse à une carence sévère en Cu (Kabata-Pendias and Pendias, 2001). La déficience réduit également la qualité des fruits en réduisant par exemple la teneur en jus dans les pommes ou en provoquant une difformité des fruits chez le citron (Alloway, 2013). Comme pour le Zn et le Fe, les principales stratégies pour maximiser l'absorption de Cu en réponse à une carence reposent sur l'accroissement du système racinaire et la libération d'acides organiques.

#### 3.3.4.1 Fonctions du Cu chez les végétaux

De par sa capacité à passer d'un état monovalent ( $\text{Cu}^+$ ) à divalent ( $\text{Cu}^{2+}$ ), le cuivre est un ion métallique très présent dans les réactions d'oxydoréductions. Chez *Arabidopsis thaliana*, 19 protéines (sur 27 243) ont été caractérisées comme contenant ou liant le Cu (Gladyshev *et al.*, 2004). Il est majoritairement présent dans les chaînes de réactions enzymatiques de la respiration dans la mitochondrie et de la photosynthèse dans les chloroplastes. Par exemple, la plastocyanine (Figure I.29) est une métalloprotéine à Cu qui assure le transfert d'électrons depuis le photosystème II vers le photosystème I. Le Cu stabilise également la conformation de protéines telles que la Zn-Cu SOD, une enzyme clé de la détoxification des composés oxydatifs dans le stroma (formés notamment au cours de la photosynthèse), fortement toxiques pour la cellule (Yruela, 2013).

#### 3.3.4.2 Absorption et transport du Cu chez les végétaux

La famille COPT (Copper transporter) constitue la famille de transporteurs présentant la plus haute affinité pour le Cu (Yruela, 2009). Au niveau racinaire, le Cu est majoritairement absorbé sous la forme de  $\text{Cu}^+$ , son transport au travers du plasmalemme serait assuré par les transporteurs COPT1 et COPT2 (Figure I.23). Alors que le cuivre est prédominant dans le sol sous la forme  $\text{Cu}^{2+}$ , des réductases de





type FRO (FRO4 et FRO5) sont exprimées à la surface racinaire afin de réduire le  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$  (Figure I.23). L'excès de Cu libre peut provoquer de graves dommages oxydatifs au sein de la cellule. Aussi, dès qu'il a été absorbé, il est complexé à des métallothionéines ou des protéines chaperonnes de Cu, telles que AtCCH (Copper Chaperone) ou AtCOX17 (Cytochrome c Oxidase copper chaperone) chez *Arabidopsis thaliana*.

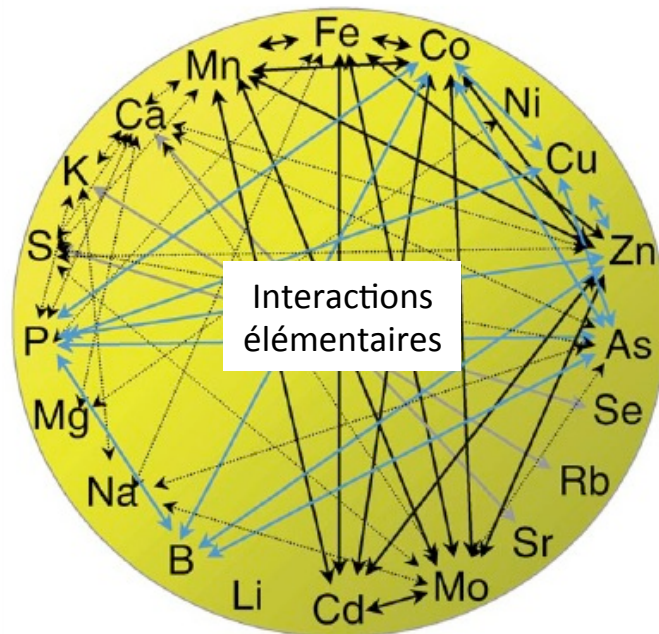
Les transporteurs HMA (voir partie 5.1.3, Zn), YS-YSL et ZIP (voir partie 5.1.1, Fe) font également partie des transporteurs capables de transporter le Cu. Les transporteurs YS-YSL et ZIP4 peuvent ainsi transporter respectivement le Cu complexé à un phytosidérophore et le  $\text{Cu}^{2+}$ . HMA6 (aussi appelé PAA1) transporte le  $\text{Cu}^+$  à travers la membrane chloroplastique et HMA8 permet l'influx de  $\text{Cu}^+$  à travers la membrane thylakoïdienne. HMA1 transporte également le Cu à travers la membrane chloroplastique, mais sous la forme de  $\text{Cu}^{2+}$  (Figure I.23) alors que HMA5, HMA6, HMA7, HMA8 et HMA9 transportent le  $\text{Cu}^+$  (Yruela, 2013).

### 3.3.5 Interactions éléments-éléments

La biostimulation par fertilisation trouve notamment ses limites dans les interactions entre éléments au niveau du sol. En effet, un apport trop important d'un élément peut perturber la phytodisponibilité d'un autre élément. Ceci a été particulièrement démontré dans le cas des interactions Cu et Zn, Mn et Zn ainsi que Fe et Mn (Alloway, 1976).

Plus les découvertes en biologie avancent et plus la vision des événements ayant lieu dans un organisme, un organe ou une cellule se complexifie. Nous devons ainsi avoir pleinement conscience qu'une perturbation d'un processus peut entraîner une réaction en cascade à travers de multiples voies de signalisation. Ceci est particulièrement vrai pour les éléments minéraux.

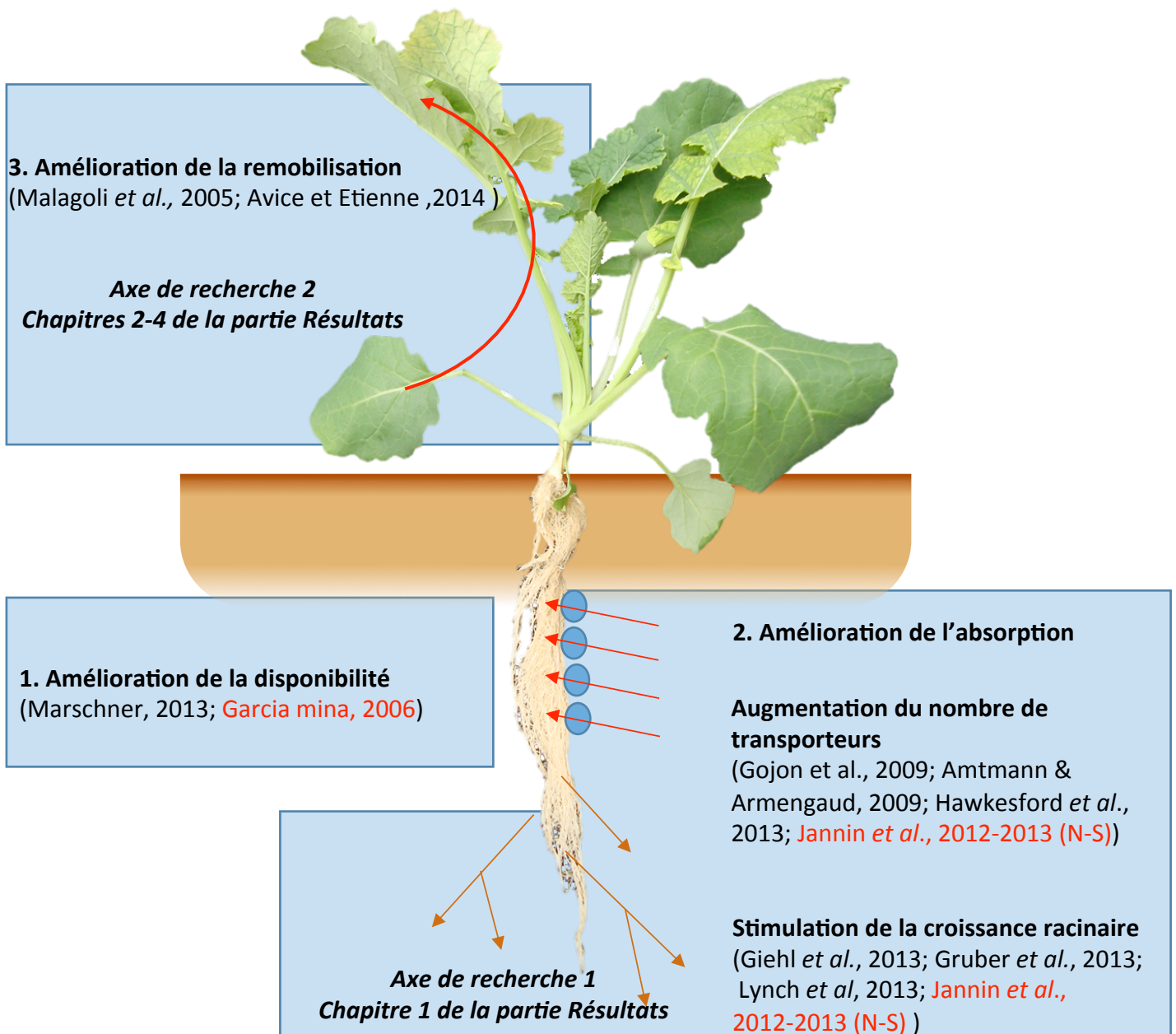
Tout d'abord, une cellule a besoin d'un certain équilibre pour survivre, en particulier d'un équilibre osmotique et acido-basique. Or, les particules élémentaires sont chargées lorsqu'elles sont libres dans la cellule (monovalentes  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ..., divalentes  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ...) et la régulation de leur transport ou de leur compartimentation cellulaire est ainsi primordiale pour maintenir l'homéostasie cellulaire. Il faut donc avoir à l'esprit qu'une dérégulation de l'absorption d'un élément comme par exemple le Mg (fortement impliqué dans l'équilibre osmotique) peut avoir une incidence sur les voies métaboliques impliquant des enzymes



**Figure I.30.** Interactions génétiques, physiologiques et chimiques entre éléments. Ceci n'est qu'une partie des interactions connues. En noir: interactions entre éléments selon le modèle Fe provenant de Baxter *et al.* (2008). En bleu: interactions entre éléments selon le modèle P provenant de Baxter *et al.* (2008). Ces modèles ont été réalisés en mesurant le contenu élémentaire dans des plantes d'*Arabidopsis thaliana* soumises à différents niveaux d'apports en Fe ou P. En gris: analogues chimiques. Adapté de Baxter *et al.*, 2009.

dépendantes de cet élément, mais également sur les autres cations et anions, dont la teneur évoluera pour contrebalancer l'absence d'ion  $Mg^{2+}$ .

Les transporteurs jouent aussi un rôle primordial dans la régulation croisée du métabolisme des éléments minéraux. A cause des similarités physicochimiques de certains éléments, les transporteurs sont le plus souvent aspécifiques et peuvent transporter plusieurs éléments. Ainsi, les transporteurs ayant une forte affinité pour le  $Fe^{2+}$  tels que IRT1 et NrAMP3 (Figure I.21) transportent également d'autres ions divalents tels que  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ou encore  $Cd^{2+}$ , un métal lourd toxique (Puig and Peñarrubia, 2009). De nombreux carrefours métaboliques sont également reportés de manière plus ponctuelle. Par exemple, CNX1, une enzyme impliquée dans la régulation et l'assimilation du molybdène, est fortement dépendante de la concentration cellulaire en  $Zn^{2+}$ , reliant ainsi les métabolismes de ces deux éléments. Ainsi, les interactions entre éléments sont hautement complexes et sensibles aux variations de teneurs de chacun d'entre eux. (Figure I.30, (Baxter, 2009). Ces interactions entre éléments sont encore mal connues mais sont désormais de plus en plus étudiée dans le cadre d'approches dites de « ionomiques ». Ces interactions élémentaires nécessitent aussi d'être mieux appréhendées afin d'éviter que des projets de biofortification en un élément d'intérêt conduisent à une déstabilisation de l'homéostasie cellulaire.



**Figure I.31.** Stratégies potentielles adoptées par les plantes en cas de carence nutritionnelle. En cas de privation totale, les stratégies 1 et 2 ne sont plus utilisables par les végétaux, ne laissant que la remobilisation comme source de nutriments pour la croissance des jeunes tissus. En noir: référence décrivant la stratégie. En rouge: références décrivant l'effet bénéfique d'un biostimulant sur le processus. Les observations de Jannin *et al.* (2012; 2013) n'ont été réalisées que sur l'azote et le soufre.

## OBJECTIFS DE RECHERCHE

---

**Le premier objectif de ce travail de thèse** visait, dans le cadre d'un co-financement de l'allocation doctorale par Timac Agro International (50%) et la Région Basse-Normandie (50%), à poursuivre le travail doctoral réalisé par L. Jannin en 2012. Plus particulièrement, il s'agissait d'étendre la caractérisation des effets biostimulants des extraits algaux AZAL5 et humique E7 à l'ensemble du métabolisme des éléments minéraux afin de déterminer si un rôle en tant que biofortifiant était ou non envisageable. Ce travail sera présenté au sein du premier chapitre des résultats (numéroté « chapitre II ») sous la forme d'un article publié en 2013 dans *Journal of Plant Growth Regulation*.

**Le deuxième objectif de ce travail doctoral** découlait en partie de l'analyse bibliographique précédemment exposée et des résultats précédemment acquis, à savoir un effet potentiel d'AZAL5 et E7 comme biostimulants sur les métabolismes du fer, du zinc, du cuivre et du magnésium que ce soit en termes d'absorption racinaire et de translocation des racines vers les feuilles. Comme nous l'avons évoqué, trois processus majeurs limitent la teneur en nutriment dans un organe : l'absorption depuis les racines et son allocation vers celui-ci, mais aussi la remobilisation à son profit ou à son dépend vers les tissus en croissance (Figure I.31). L'étude de la première composante repose majoritairement sur l'étude des transporteurs racinaires. Pour chaque élément, plusieurs transporteurs ont déjà été identifiés et de nombreuses équipes de recherche travaillent sur les mécanismes de régulation de ces transporteurs. L'étude de la remobilisation a quant à elle été bien moins explorée, en particulier pour des éléments comme le cuivre, le magnésium, le zinc et le fer (Pottier *et al.*, 2014).

Le deuxième objectif de cette recherche doctorale visait donc à déterminer l'existence d'une remobilisation foliaire de ces éléments. Pour ce faire, des cultures de colza en condition de privation totale pour chacun des éléments étudiés ont été mises en place afin de quantifier leur remobilisation potentielle sans avoir à recourir à l'emploi d'isotope stable. Parallèlement, des analyses multiélémentaires par ICP-MS ont été réalisées afin de mettre en évidence les possibles interactions entre éléments minéraux. Enfin, pour chaque situation de privation, une approche de protéomique comparative couplée à une approche de transcriptomique ciblée (aux



gènes codant les transporteurs racinaires des éléments d'intérêt) ont été conduites afin de mieux appréhender les modifications métaboliques majeures induites par la privation. Pour des raisons inhérentes à la durée d'une thèse, seuls le cuivre, le magnésium et le zinc ont été abordés dans le cadre de ce travail doctoral. Les chapitres III à V des résultats correspondent à 3 articles scientifiques publiés (Plos One) ou en cours de soumission (Metallic, Journal of Plant Physiology and Biochemistry)

Ce document de thèse présente au sein du dernier chapitre les conclusions issues de ce travail, leur discussion ainsi que les perspectives de recherche qui en découlent.

Pour répondre à ces deux objectifs de recherche, nous avons utilisé le colza, plante modèle au laboratoire depuis 1992. Chez cette espèce, les processus physiologiques et moléculaires impliqués dans la remobilisation de l'azote et du soufre ont ainsi été largement décrits (Abdallah *et al.*, 2010 ; Dubousset *et al.*, 2010 ; Faure-Rabasse *et al.*, 2002 ; Lainé *et al.*, 1993 ; Malagoli *et al.*, 2005). C'est aussi le colza qui a été utilisé pour effectuer un screening de molécules potentiellement biostimulantes lors du doctorat de L. Jannin (2012). Enfin, en tant que brassicacée, le colza présente l'avantage d'être génétiquement proche d'*Arabidopsis thaliana*, permettant ainsi d'accéder à de nombreux outils, notamment moléculaires, identifiés chez *Arabidopsis thaliana*.

Ce travail doctoral a fait l'objet d'une valorisation sous la forme d'articles publiés ou en cours de soumission suivants :

- Vincent Billard, Laetitia Jannin, Philippe Etienne, Florence Cruz, Jean-Claude Yvin, Alain Ourry, 2014. Two biostimulants from different origins act similarly on winter oilseed rape gene expression and mineral content. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33, 305-316.

- Vincent Billard, Alain Ourry, Anne Maillard, Maria Garnica, Laurent Coquet, Thierry Jouenne, Florence Cruz, José-Maria Garcia-Mina, Jean-Claude Yvin, Philippe Etienne. 2014. Copper-deficiency in *Brassica napus* induces copper remobilization, molybdenum accumulation and modification of the expression of chloroplastic proteins. *PLOS One*, sous presse.

- Vincent Billard, Philippe Etienne, Anne Maillard, Maria Garnica, Laurent Coquet, Thierry Jouenne, Florence Cruz, José-Maria Garcia-Mina, Jean-Claude





Yvin, Alain Ourry. Leaf magnesium remobilization induced by Mg deficiency is a senescence-independent process in *Brassica napus* L. Soumis à J. Exp Bot.

- Vincent Billard, Alain Ourry, Anne Maillard, Maria Garnica, Florence Cruz, José-Maria Garcia-Mina, Jean-Claude Yvin, Philippe Etienne. Zn depletion in *Brassica napus* induce Mo et Mn accumulation associated with leaf proteins variation but no Zn remobilization. Soumis à Plant Physiology et Biochemistry.

Et des communications orales qui suivent :

- Vincent Billard, Laetitia Jannin, Philippe Laîné, José-Maria Garcia-Mina, Alain Ourry, Jean-Claude Yvin, Philippe Etienne. 2012. *Brassica napus* nutrient uptake and plastid division are affected by a new seaweed extract from *Ascophyllum nodosum*. 15<sup>ème</sup> journée de l'Ecole doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement, 23 mars 2012, Rouen, France.

- Vincent Billard, Laetitia Jannin, Philippe Laîné, José-Maria Garcia-Mina, Alain Ourry, Jean-Claude Yvin, Philippe Etienne. 2012. A New Seaweed Extract Affects *Brassica napus* Nutrient Uptake and Plastid Division. Congrès « Plant Growth, Nutrition et Environment Interactions », 18-21 février 2012, Vienne, Autriche.

- Vincent Billard, Philippe Etienne, Anne Maillard, Laurent Coquet, Thierry Jouenne, Jean-Claude Yvin, Alain Ourry, Cu deficiency in *Brassica napus*: deciphering plant response et potential solution through biostimulation. 15e journée de l'Ecole doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement, 10-11 avril 2014, Le Havre, France.



## CHAPITRE 2 : Deux biostimulants dérivant d'algues et d'acide humique induisent une réponse similaire du contenu minéral et de l'expression de gènes chez le colza (*Brassica napus* L.)

---

### Avant-propos

Afin d'évaluer le potentiel de biofortification en nutriments par des biostimulants d'origine naturelle, nous avons traité des cultures de colza en condition contrôlées avec deux biostimulants d'origine différentes : AZAL5 et HA7. Ils ont été précédemment décrits au laboratoire par Laetitia Jannin. Le premier est un extrait d'algue et le second un extrait d'acide humique mais tous deux ont des effets positifs sur le colza, notamment sur la croissance et les métabolismes azotés et soufrés.

Les résultats précédents, obtenues par L. Jannin sur AZAL5 et HA7 et publiés séparément, ont ainsi été comparés afin de déterminer les similitudes entre les deux extraits.

Ce travail comporte une analyse ionomique de l'effet de ces **extraits pour évaluer les potentialités de biofortification par ces extraits**, ainsi que des analyses transcriptomiques ciblées afin **d'identifier des transporteurs qui serait à l'origine des variations du contenu élémentaire.**

#### Résultats majeurs :

- **AZAL5 et HA7 améliorent l'absorption de Cu et Mg chez le colza,**
- **AZAL5 induit une translocation de Zn des racines vers les parties aériennes. Le même phénomène a été observé pour le Fe en réponse à un apport d' HA7.**

Ces résultats ont été publiés sous la forme d'un article dans "Journal of Plant Growth Regulation", intitulé « Two biostimulants derived from algae or humic acid induce similar responses in the mineral content and gene expression of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) »



**Two biostimulants derived from algae or humic acid induce similar responses in the mineral content and gene expression of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.)**

Vincent Billard<sup>1,2,3</sup>, Philippe Etienne<sup>1,2,3</sup>, Laetitia Jannin<sup>1,2,3</sup>, Maria Garnica<sup>4</sup>, Florence Cruz<sup>5</sup>, José-Maria Garcia-Mina<sup>4</sup>, Jean-Claude Yvin<sup>5</sup>, Alain Ourry<sup>1,2,3,6</sup>,

1. Normandie Univ, France

2. UNICAEN, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, F-14032 Caen, France

3. INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, F-14032 Caen, France

4. Timac Agro Spain, Poligono de Arazuri-Orcoyen Calle C n°32, 31160 Orcoyen, Spain

5. Centre de Recherche International en Agroscience, CRIAS-TAI, Groupe Roullier, 55 boulevard Jules Verger, 35800 Dinard, France

6. Corresponding author: alain.ourry@unicaen.fr, phone: +33 231 565 653, fax: +33 231 565 360.

**E-mail of each author:** vincent.billard@unicaen.fr, philippe.etienne@unicaen.fr, laetitia.jannin@unicaen.fr, mgarnica@timacagro.es, fcruz@roullier.com, jgmina@timacagro.es, jcyvin@roullier.com, alain.ourry@unicaen.fr.

### Keywords

biostimulant, *Brassica napus*, macronutrient, micronutrient, humic extract, seaweed extract.



## Abstract

Different strategies, known as crop biofortification, can be used to increase micronutrient concentrations in harvested parts in order to reduce nutrient deficiencies in the human diet. Apart from fertilisation and genetic selection, a more environmentally friendly, less expensive and more immediate solution could rely on the use of biostimulants derived from natural materials. Two biostimulants, AZAL5 and HA7, which are derived from seaweed and black peat, respectively, have been previously described as promoting growth of *Brassica napus* and having a substantial effect on gene expression. They were further studied to evaluate their effects on N, S and a wide range of other nutrients (*i.e.* K, Ca, P, Mg, Fe, Na, Mn, B, Si, Cu and Zn). Providing these two biostimulants in the nutrient solution did not change the mineral supply significantly, but they mostly stimulated root growth and macronutrient uptake (N, S, K, P) at a level similar to growth. Both biostimulants also stimulate chloroplast division. More surprisingly, they also increased Mg, Mn, Na and Cu plant concentrations and root to shoot translocation of Fe and Zn. These observations were associated with an increased expression of a Cu transporter (*COPT2*) and of *NRAMP3*, a gene putatively involved in Fe and Zn translocation. Overall, this study showed that specific nutrient balance and transport were stimulated by both biostimulants more significantly than growth, offering new perspectives for biofortification strategies.

## Abbreviations

ICP-OES: Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry.  
IRMS: Isotope Ratio Mass Spectrometer. Q-PCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction. RT: Reverse Transcription. WOSR: Winter Oil Seed Rape.





## 1 Introduction

The first goal of the “green revolution” has been partially achieved as it has certainly saved billions of people from starving to death, decreasing the percentage of undernourished people worldwide from 26% in 1971 to 13% in 2008 (FAO, 2009). Despite sufficient calories in the diet, another kind of malnourishment arises that is commonly called “hidden hunger” due to a deficiency of nutrients. According to the World Health Organisation (2002), iron (Fe) and zinc (Zn) are deficient in the diet of more than half of the world’s population. Moreover, magnesium (Mg) and copper (Cu) are also deficient for some of the population (White and Broadley, 2005). For example, the national diet and nutrition survey in the United Kingdom (Ruston *et al.*, 2004) revealed that 10% of men and 14% of women had a Mg intake below the lower recommended nutrient intake, zinc was deficient for 4% of the population and Fe for 25% of women. These nutrient deficiencies are amplified by a constant plummet in mineral concentrations in grain, among them Fe, Zn, Cu (Fan *et al.*, 2008 ; Garvin *et al.*, 2006) and Mg (Fan *et al.*, 2008). It has been postulated that this loss of harvest quality was the result of varietal selection over the past 60 years that aimed to achieve higher yield under a sufficient macronutrient supply and despite sufficient micronutrient content in the soil (Fan *et al.*, 2008).

Cu, Fe, Zn and Mg are also of great importance for plant metabolism, meaning that both harvest quality and crop development can be limited by their availability. As for other organisms, Zn is crucial for many transcription factors because they possess zinc finger domains. Mg is probably best known for its central position in the chlorophyll molecule where it coordinates covalently with four nitrogen atoms in the porphyrin ring (Sirijovski *et al.*, 2008). Moreover, Fe, Cu and Mg are important for metalloprotein activities involved in electron transport during photosynthesis in chloroplasts. As a result, over 80% of total plant Fe and 50% of Cu is located in chloroplasts (Hänsch and Mendel, 2009 ; Smith, 1984).

To prevent nutrient deficiencies, biofortification programmes have been developed. Biofortification principles aim to increase nutrient concentrations in edible parts of the plant in order to recover these nutrients in the human diet (Guerinot and Salt, 2001). Research in this domain tends to focus either on nutrient uptake, translocation from roots to the aerial parts of the plant and/or on storage (Zhao and McGrath, 2009). Biofortification strategies rely initially on chemical nutrient fertilisation, with associated increased cost and potential environmental



impacts. Another approach focuses on varietal selection, aiming at increasing uptake and translocation to plant edible parts, but this type of research can take more than 20 years before obtaining new varieties for food production. A third strategy relies on development of new fertilisers and biostimulants that are more efficient than traditional chemicals. By definition (Schimdt *et al.*, 2003), biostimulants from natural raw materials fulfil three conditions sought in today's agriculture. (i) Economic: in contrast to chemical fertilisers, whose prices are determined by energy costs, natural raw material prices are not indexed to the cost of the oil stock price. (ii) Yield: biostimulants increase productivity. (iii) Environmental: biostimulants do not have a dramatic impact on the environment as they are derived from slightly transformed natural materials. Their effects are usually explained by nutrient, hormone or hormone-like content (Muscolo *et al.*, 2007) present in raw materials, mostly derived from seaweed or humic acids.

Biostimulant formulation (although relatively faster compared to variety selection) relies mainly on time-consuming screening of extracts produced using various processes. Indeed, biostimulants can be made from a huge range of materials and their compounds and the effects are mostly specific to the initial raw material, the process used, the plant variety and application methods. In order to increase the development of new biostimulants, it is necessary to find similarities between them so that future screening might be faster. Two biostimulants, one algal extract from *Ascophillum nodosum* (named AZAL5) and a second one derived from humic acids of black peat (named HA7), were described to have similar physiological and molecular effects on winter oilseed rape (WOSR) *Brassica napus* (Jannin *et al.*, 2013, 2012). *Brassica napus* is an important agricultural crop that needs high fertilisation levels (especially N and S fertilisers) to reach high yields. WOSR shows a low nitrogen use efficiency (defined by the ratio of seed to plant N content) especially due to the defect in leaf N mobilisation (Desclos *et al.*, 2008 ; Etienne *et al.*, 2007) during senescence occurring during vegetative stage. Additionally, in WOSR, S mobilisation from leaves to the seeds is not associated with a senescence process but is linked to induction of sulphur transporters allowing the mobilisation of sulphate stored in leaves (Abdallah *et al.*, 2010). Accordingly, WOSR is also highly sensitive to S deficiency with consequences for yield and seed quality (Dubousset *et al.*, 2010). Therefore, WOSR constitutes a relevant model with a defective agro-environmental balance that might be improved by up-regulating



nutrient use efficiency by the addition of biostimulants. Moreover, its genetic proximity to *Arabidopsis thaliana* provides easy access to molecular tools while maintaining an agronomic relevance.

The aim of this study was to compare the effects of two biostimulants on WOSR, focusing on mineral nutrition, and more especially on changes in Cu, Fe, Mg and Zn content, as well as on the expression of genes encoding their transporters. Despite their different origins, both of the biostimulants increased plant biomass, N and S metabolism, and the number of chloroplasts per cell (Jannin *et al.*, 2012a,b).

## 2. Material and methods

### 2.1 Growth conditions

Seeds of *Brassica napus* var. Capitol were surface-sterilised by exposure to 80% ethanol for 30s followed by 20% sodium hypochlorite for 10 min. After 10 washes with demineralised water, seeds were germinated on perlite over demineralised water for 2 days in the dark and 1 week in the light in a greenhouse. Just after first leaf emergence, seedlings were transferred to a 20 L plastic tank containing Hoagland nutrient solution with the following composition: KNO<sub>3</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.25 mM, KCl 250, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.25 mM, MgSO<sub>4</sub> 0.5 mM, EDTA-2NaFe 0.2 mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 14 μM, Mn SO<sub>4</sub> 5μM, ZnSO<sub>4</sub> 3 μM, CuSO<sub>4</sub> 0.7 μM, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 0.7 μM and CoCl<sub>2</sub> 0.1 μM. This nutrient solution was renewed every two days. Plants were grown under greenhouse conditions with a thermoperiod of 20°C/17°C day/night and a photoperiod of 16 h. Natural light was supplemented with high pressure sodium lamps (Philips, MASTER GreenPower T400W) supplying an average photosynthetically active radiation of 280 μmol photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> at canopy height. Plants were grown for one week before treatment with HA7 humic extract or AZAL5 seaweed extract.

### 2.2 Extraction and composition of *Ascophyllum nodosum* extract AZAL5

The fresh algae harvested on the shores of Brehat island (France) in October 2008 was washed, shredded and added to water. The solution was acidulated with concentrated 95% sulphuric acid to pH 3. The mixture was homogenised to micro-rupture the algal cells then centrifuged and filtered. The final solution was then concentrated as described by Briand (1998) to obtain dry AZAL5 extract. Before use, the dry extract was dissolved in water at a concentration of 67 g.L<sup>-1</sup>.



### 2.3 Method of preparation of the humic acid sample, HA7

The humic sample (HA7) was obtained from black peat (Galicia, Spain). The methodology for the extraction and purification used was as indicated by the International Humic Substances Society (IHSS) (Swift *et al.*, 1996) and described in (Aguirre *et al.*, 2009)). Briefly, 100 g of potassium humate were mixed with 1500 ml of 0.1M NaOH in a 2 L flask. After 48h of stirring at 25°C in darkness, the supernatant containing the unfractionated humic extract was separated from the solid fraction by centrifugation (15 min, 11100 g). The alkaline extract sample, containing humic acids and fulvic substances, was acidified with 6M hydrochloric acid (HCl) to a pH of 1.5. After 12h, the acidified sample was centrifuged (30 min, 7650 g) in order to separate the precipitated HA7 from the supernatant containing fulvic acids and other acid-soluble organic compounds. After washing with water to eliminate Cl<sup>-</sup> contamination, HA7 was freeze-dried. Dry HA7 contains 39.65% organic carbon and was dissolved in water before being used in order to reach a concentration of 2.6% organic carbon.

### 2.4 Plant treatment

After one week of growth, plants were separated into two sets: (i) control plants (Control) were grown in the nutrient solution described above (ii) AZAL5 treated plants were grown in the same nutrient solution supplied with 0.1% (v/v) of AZAL5 seaweed extract, (iii) HA7 treated plants were grown in the same solution supplied with HA7 humic acid in order to reach a concentration of 100 mg of organic carbon L<sup>-1</sup> of nutrient solution. Nutrient solutions were renewed every two days. Each set of plants (control, AZAL5 and HA7) was grown for 30 days and time courses in the experiment were expressed in days after the beginning of treatment (Day 0: addition of AZAL5 or HA7 to the nutrient solution).

For each condition (Control and treatment with AZAL5 or HA7) and each duration of treatment (1, 3 and 30 days), ten plants were harvested and total fresh weight (FW), as well as root and shoot FWs were measured. An aliquot of root and shoot tissues was weighed and dried in an oven (60°C) for dry weight (DW) determination and ground to fine powder for N and S analysis (10 replicates). Thereafter, remaining fresh root and shoot tissues were pooled into 3 replicates, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for ICP and molecular analysis.





## 2.5 Fluorescence confocal microscopy

In order to observe chloroplasts, a square of rapeseed leaf from each replicate of each treatment (Control, AZAL5 or HA7-treated plant) and each time of harvest (1, 3 and 30 days) was embedded in 5% LMPT agar (low melting point) in phosphate buffer at 40°C. After cooling, 50µm thick slices were cut with a vibratome (Microm HM650V). These slices were directly observed with confocal microscopy (Olympus FV1000) with laser excitation of autofluorescence at 458nm and emission at 650-700nm. Pictures were then analysed by ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) in order to determine the number of chloroplasts per leaf cell.

## 2.6 Analysis of nutrients in plant tissues and extracts

N and S: an aliquot of around 4mg of dry weight (DW) of each plant organ sample (shoots or roots) was placed in tin capsules for total N and S analysis using an IRMS spectrometer (Isoprime, GV Instrument, Manchester, UK) linked to a C/N/S analyser (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy). Total N or S amount (N or S<sub>Tot</sub>) in a tissue “i” at a given time “t” is calculated:

$$N_{\text{tot}} \text{ (or } S_{\text{tot}}) = \% N_{i,t} \text{ or } S_{i,t} \times DW_{i,t} / 100$$

Other nutrients (K, Ca, S, P, Mg, Fe, Na, Mn, B, Si, Zn and Cu) were measured in rapeseed shoots and roots, in AZAL5 or HA7 extracts or in Hoagland solution by ICP-OES (Thermo Elemental Co. Iris Intrepid II XDL) with prior microwave acid sample digestion (8 mL of concentrated HNO<sub>3</sub> and 2 mL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 0.5 g DW) using a protocol previously described by Mora *et al.* (2010).

## 2.7 RNA extraction

Total RNA was extracted from 200 mg of fresh roots and shoots. Frozen samples were ground to a powder with a pestle in a mortar containing liquid nitrogen. The resulting powder was suspended in 750 µl of extraction buffer [0.1 M TRIS, 0.1 M LiCl, 0.01 M EDTA, 1% SDS (w/v), pH 8] and 750 µl of hot phenol (80°C, pH 4). This mixture was vortexed for 30 s and, after addition of 750 µl of chloroform/isoamylalcohol (24:1), the homogenate was centrifuged (15 000 g, 5 min, 4°C). The supernatant was transferred into 4 M LiCl solution (w/v) and incubated overnight at 4°C. After centrifugation (15 000 g, 30 min, 4°C), the pellet was suspended in 100 µl of sterile water. RNA was then purified with an RNeasy mini kit according to the manufacturer’s protocol (Qiagen, Courtaboeuf, France). Quantification of total RNA was performed by spectrophotometry at 260 nm

**Table II.1: Q-PCR Primer sets.** *EF1 $\alpha$*  and *18S rRNA* genes were used as reference for relative gene expressions by Q-PCR analysis.

Gene	Accession number	Forward	Reverse
<i>EF1-<math>\alpha</math></i>	DQ312264	5'-gcctggtatggttgacct-3'	5'-gaagtagcagcacccttg-3'
<i>18S rRNA</i>	GQ380689	5'-cggataaccgtagtaattctag-3'	5'-gtactattccaattaccagac-3'
<i>BnNRT1.1</i>	AJ278966	5'-tggtggaataggcggctcgagtg-3'	5'-gtatacgtttgggtcattgccat-3'
<i>BnNRT2.1</i>	AJ293028	5'-atgtaacggaagtcctg-3'	5'-tgattcgagctgtgtgaagc-3'
<i>BnSULTR1.1</i>	AJ416640	5'-agatattcgatcgaccag-3'	5'-gaaaacgccagcaaagaaag-3'
<i>BnSULTR1.2</i>	AJ311288	5'-ggtgtagtgcctggaatgt-3'	5'-aacggagtgaggaagagcaa-3'
<i>COPT2</i>	NM_114557	5'-tgcacatgacctcttttg-3'	5'-gtcatcggagggtttgtga-3'
<i>NRAMP3</i>	NM_127879.3	5'-cagcaatgggtcttttggt-3'	5'-gccactggcttagcttgac-3'
<i>MRS2-10</i>	NM_106738.1	5'-tgctccagttctctgttc-3'	5'-ccgttgaatgtgatgaaac-3'
<i>IRT1</i>	NM_118089.3	5'-tggtgttgagctcctctct-3'	5'-taccactgcgttcttctg-3'

(BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq, France) before Reverse Transcription (RT) and real-time Quantitative PCR (Q-PCR) analysis.

## 2.8 Reverse transcription and Q-PCR analysis

For reverse transcription, 1 µg of total RNA was converted to cDNA with an “iScript cDNA synthesis kit” according to the manufacturer’s protocol (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France).

Q-PCR amplifications were performed using specific primers for each housekeeping gene (*EF1-α* and *18S rRNA*) and target genes (Table II.1). Q-PCRs were performed with 4 µl of 200x diluted cDNA, 500 nM of primers, and 1x SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad) in a CFX96 Real Time System (Bio-Rad). A 2 step program, composed of 42 cycles of a denaturing step at 95°C for 15 s followed by an annealing and extending step at 60°C for 40 s, was used for all pairs of primers except for *COPT2* and *IRT1*, for which we used a 3 step program. For these, the denaturing step was as described previously. Annealing was at 58.6°C for *COPT2* and 94.4°C for *IRT1* for 10 s and was followed by an extending step at 72°C for 30 s. For each pair of primers, a threshold value and PCR efficiency were determined using a cDNA preparation diluted >10-fold. For all pairs of primers, PCR efficiency was around 100%. The specificity of PCR amplification was examined by monitoring the presence of the single peak in the melting curves after Q-PCRs and by sequencing the Q-PCR product to confirm that the correct amplicon was produced from each pair of primers (Biofidal, Vaulx en Velin, France). For each sample, the subsequent Q-PCRs were performed in triplicate. The relative expression of the genes in each sample was compared with the control sample [corresponding to untreated plants at the same time of harvest] and was determined with the delta delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) method using the following equation (Livak and Schmittgen, 2001):

$$\text{Relative expression} = 2^{-[\Delta Ct_{\text{treated}} - \Delta Ct_{\text{control}}]},$$
$$\text{with } \Delta Ct = Ct_{\text{target gene}} - [\sqrt{(Ct_{EF1-\alpha} \times Ct_{18S rRNA})}]$$

Where Ct refers to the threshold cycle determined for each gene in the exponential phase of PCR amplification and  $[\sqrt{(Ct_{EF1-\alpha} \times Ct_{18S rRNA})}]$  corresponds to the geometric average of Ct of the reference genes. Using this analysis method, relative expression of the different genes in the control sample of the experiment was equal to 1 (Livak and Schmittgen, 2001), and the relative expression of other treatments was then compared with the control, on this basis.

**Table II.2: Relative total dry weight of AZAL5 or AH7 treated plants and relative chloroplast number in leaf cells from AZAL5 or AH7 treated plants. NS: Not significant. Relative shoot (S) and root (R) dry weights are indicated in parentheses when relative total dry weight is significant.**

Treatment	Relative total dry weight		Relative number of chloroplast per leaf cell	
	AZAL5	HA7	AZAL5	HA7
1d	NS	NS	+57.6±5.1%	+43.2±6.7%
3d	NS	NS	+45.6±6.1%	+9.5±2.6%
30d	+38.0±7.3% (S:+23.8±8.6%; R:+102±13.4)	+29.0±11.5% (S:NS; R:+88±19%)	+144±18.7%	+130.3±6.5%

## 2.9 Data and statistical analysis

Regarding growth and IRMS analysis, experiments were conducted with 10 replicates. In the case of ICP and Q-PCR, 3 replicates were used for each sample. For Q-PCR, only variations of at least 4 fold (corresponding to 2 CTs) and with a p-value less than 0.05 were taken into account and SE was calculated based on  $\Delta\Delta Ct$ , when the relation between values is still linear, using the formula

$$|2^{-\Delta\Delta Ct} - 2^{-(\Delta\Delta Ct \pm SE)}|.$$

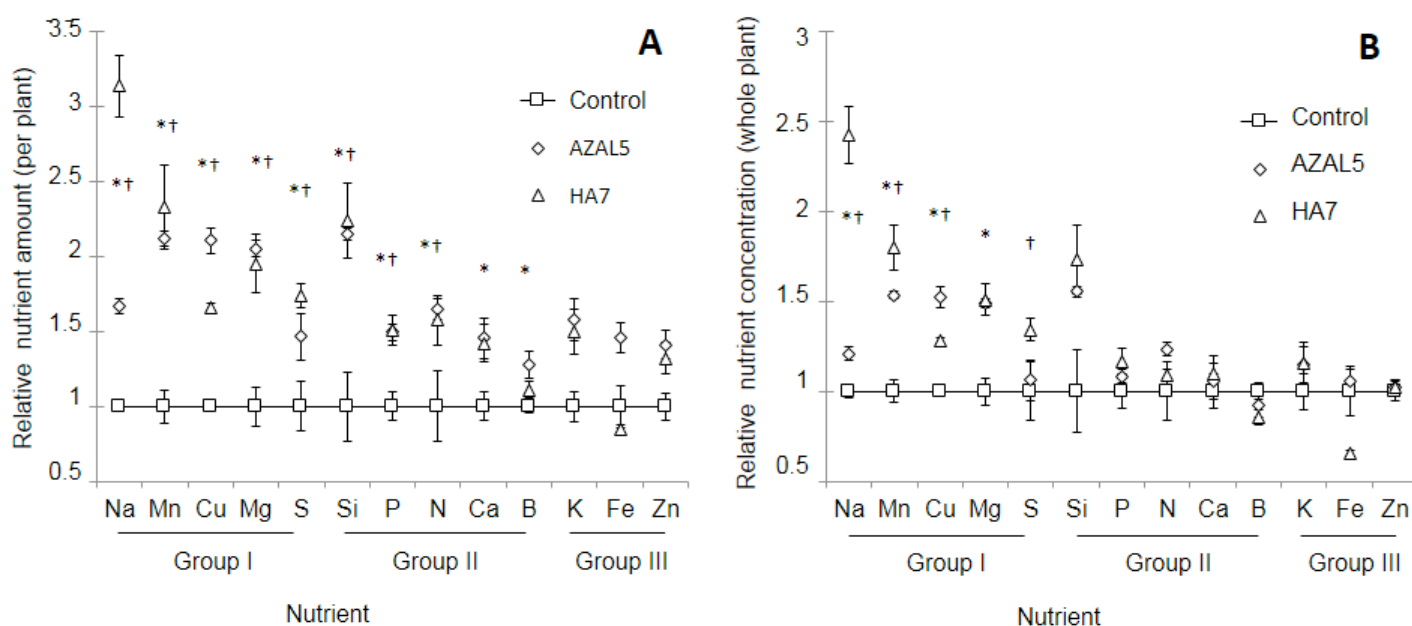
SE is reported as [lower limit]  $\leq$  [mean]  $\leq$  [upper limit] for Q-PCR, whose limits are different, and as [mean]  $\pm$  SE for other data, whose upper and lower 95% confidence limits are identical. All data were analysed by Student's test ( $p < 0.05$ ) and marked by an asterisk (\*) or cross (†) when significantly different.

For microarray results, data were extracted from Jannin *et al.* 2012a and b. For each time and treatment, only genes whose expression was modified by at least a 5 fold change (chosen as a threshold) were included in the list of differentially expressed genes.

## 3. Results

### 3.1 AZAL5 and HA7 increased biomass and chloroplast number

In the short term (after 1d or 3d of treatment, Table II.2), AZAL5 and HA7 treatment have no impact on relative total dry weight. After 30d, total dry weight of control plants was 3.60 g.plant<sup>-1</sup> with shoot and root dry weights representing 2.95 g.plant<sup>-1</sup> and 0.65 g.plant<sup>-1</sup>, respectively. As presented in table 2, total dry weights of plants treated by AZAL5 or HA7 over 30 days were increased by 38 and 29%, respectively. Concerning the AZAL5 treatment, this increase could be explained by a high increase in root biomass (+102%) and an increase in shoot biomass (+23%). In contrast, the HA7 treatment affects only the root biomass of treated plants (+88%). For both sets of treated plants the relative number of chloroplasts in leaf cells was significantly higher as early as 1d after treatment (Table II.2). For example, after 1 day of treatment with AZAL5 and HA7, the relative numbers of chloroplasts were increased by 57.6% and by 43.2% respectively. After 30d, this relative number of chloroplasts reached maximum values: +144.0% and +130.3% in leaves treated by AZAL5 and HA7, respectively.



**Figure II.1: Relative nutrient amounts and concentrations in whole plants of *Brassica napus* treated with AZAL5 or AH7 for 30 days. A:** Relative nutrient amounts per plant. **B:** Relative nutrient concentrations in whole plants. For each nutrient, the amount or concentration in control plants was equal to 1 and the relative nutrient amount (A) or concentration (B) in treated plants was obtained by comparison to control. Square: control; diamond: AZAL5 treated plants; triangle: AH7 treated plants. Vertical bars indicate  $\pm$  standard errors (for  $n=3$ ) of the mean. \* and † represent significant differences at  $p<0.05$  for AZAL5 and AH7, respectively.

		N	K	Ca	S	P	Mg
Amount (mg.plant <sup>-1</sup> )	Shoots	<b>66.5</b> $\pm$ 0.3	<b>48.3</b> $\pm$ 9.1	<b>46.1</b> $\pm$ 4.9	<b>22.6</b> $\pm$ 4.7	<b>8.2</b> $\pm$ 1.2	<b>5.3</b> $\pm$ 0.9
	Roots	<b>18.2</b> $\pm$ 2.3	<b>18.5</b> $\pm$ 2.5	<b>2.5</b> $\pm$ 0.2	<b>7.0</b> $\pm$ 0.2	<b>2.6</b> $\pm$ 0.2	<b>1.2</b> $\pm$ 0.2
	Whole Plant	<b>84.7</b> $\pm$ 9.9	<b>66.8</b> $\pm$ 6.7	<b>48.6</b> $\pm$ 4.7	<b>29.6</b> $\pm$ 4.8	<b>10.8</b> $\pm$ 1	<b>6.5</b> $\pm$ 0.8
Concentration (mg.g <sup>-1</sup> DW)	Shoots	<b>22.5</b> $\pm$ 3.1	<b>16.4</b> $\pm$ 3.1	<b>15.6</b> $\pm$ 1.7	<b>7.7</b> $\pm$ 1.6	<b>2.8</b> $\pm$ 0.4	<b>1.8</b> $\pm$ 0.2
	Roots	<b>27.9</b> $\pm$ 3.5	<b>28.5</b> $\pm$ 3.8	<b>3.8</b> $\pm$ 0.3	<b>10.7</b> $\pm$ 0.3	<b>4.0</b> $\pm$ 0.3	<b>1.8</b> $\pm$ 0.1
	Whole Plant	<b>23.5</b> $\pm$ 2.8	<b>18.6</b> $\pm$ 1.9	<b>13.5</b> $\pm$ 1.3	<b>8.2</b> $\pm$ 1.3	<b>3.0</b> $\pm$ 0.3	<b>1.8</b> $\pm$ 0.1

		Fe	Na	Mn	B	Si	Zn	Cu
Amount ( $\mu$ g.plant <sup>-1</sup> )	Shoots	<b>107.9</b> $\pm$ 17.3	<b>268.8</b> $\pm$ 18.9	<b>271.5</b> $\pm$ 35.1	<b>97.7</b> $\pm$ 5.7	<b>68.9</b> $\pm$ 13.6	<b>59.4</b> $\pm$ 10.7	<b>13.0</b> $\pm$ 1.1
	Roots	<b>925.8</b> $\pm$ 132.2	<b>114.1</b> $\pm$ 13.6	<b>54.5</b> $\pm$ 1.4	<b>11.3</b> $\pm$ 0.8	<b>157.0</b> $\pm$ 43.5	<b>31.5</b> $\pm$ 3.3	<b>11.5</b> $\pm$ 1.6
	Whole Plant	<b>1033.7</b> $\pm$ 144.8	<b>382.9</b> $\pm$ 13.1	<b>326.0</b> $\pm$ 36.1	<b>109.0</b> $\pm$ 5.3	<b>225.8</b> $\pm$ 52.2	<b>90.9</b> $\pm$ 8.1	<b>24.5</b> $\pm$ 0.4
Concentration ( $\mu$ g.g <sup>-1</sup> DW)	Shoots	<b>36.6</b> $\pm$ 5.8	<b>91.1</b> $\pm$ 6.4	<b>92.0</b> $\pm$ 6.9	<b>33.1</b> $\pm$ 1.9	<b>23.3</b> $\pm$ 4.6	<b>20.1</b> $\pm$ 2.1	<b>4.4</b> $\pm$ 0.4
	Roots	<b>1424.3</b> $\pm$ 203.4	<b>175.5</b> $\pm$ 20.9	<b>83.9</b> $\pm$ 1.3	<b>17.4</b> $\pm$ 1.3	<b>241.5</b> $\pm$ 66.9	<b>48.4</b> $\pm$ 3.0	<b>17.7</b> $\pm$ 2.4
	Whole Plant	<b>287.1</b> $\pm$ 40.2	<b>106.4</b> $\pm$ 3.6	<b>90.6</b> $\pm$ 5.8	<b>30.3</b> $\pm$ 1.5	<b>62.7</b> $\pm$ 14.5	<b>25.2</b> $\pm$ 14.5	<b>6.8</b> $\pm$ 1.3

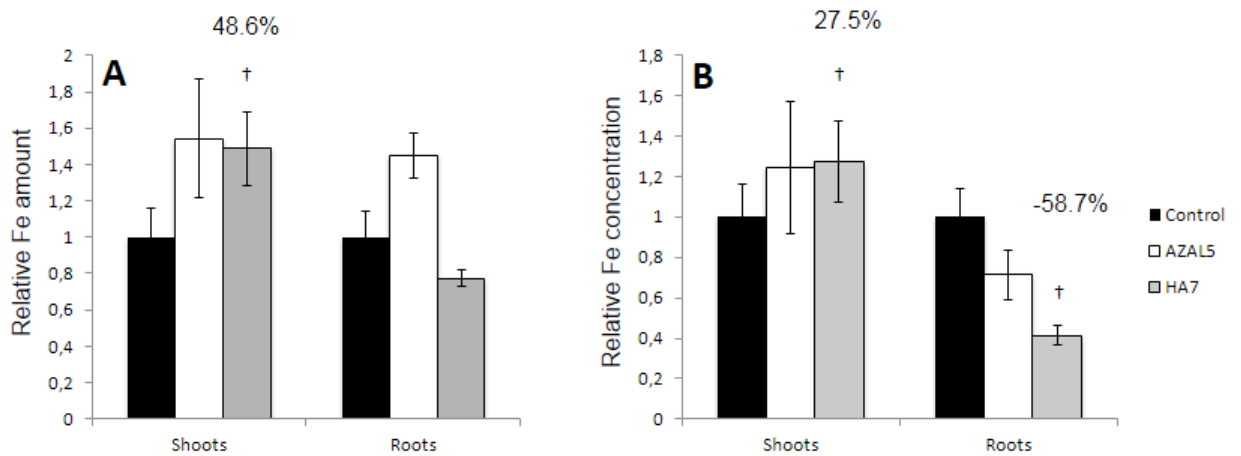
**Table II.3: Absolute amounts and concentrations of different macro (N, K, Ca, S, P and Mg) or micro (Fe, Na, Mn, B, Si, Zn and Cu) elements in *Brassica napus* shoots, roots or whole plants after 30 days of the experiment. Each values is given as the mean (in bold) of amounts or concentrations  $\pm$  standard error for  $n=3$ .**

### 3.2 Mineral concentrations and amounts per plant

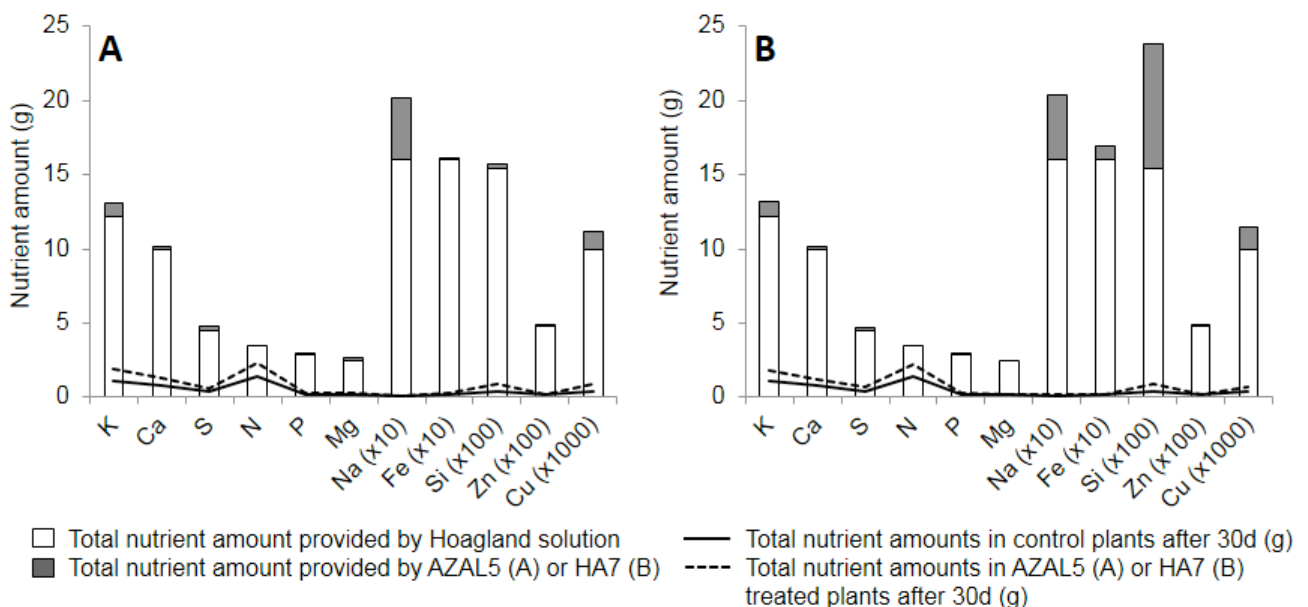
Because of the wide range of concentrations found for all nutrients tested, the amounts of mineral per plant and their concentrations given in Figure II.1A and B. were expressed relative to the control. However, in order to allow some recalculations of concentrations or the amount of each mineral element analysed in treated plants, absolute values obtained at 30 d for control plants are indicated in Table II.3. Thus, as presented in this table, macronutrients (*i.e.* N, K, S, P and Mg) and micronutrients (*i.e.* Fe, Na, Mn, B, Si, Zn and Cu) were found in the range of several mg and  $\mu\text{g}$  per plant, respectively. In response to AZAL5 and HA7 treatments, the relative amounts per plant of all nutrients increased (Figure II.1A) and were consistent with the increase in whole plant biomass (+38.0% for AZAL5 and +29.0% for HA7). However, regarding mineral concentrations in whole plant tissues, distinct patterns of elements have been observed in response to the AZAL5 or HA7 treatments (Figure II.1B). For example, in plants treated with AZAL5 or HA7 the concentration of several elements increased (Na, Mn, Cu and Mg), while concentrations of other elements remained unchanged (or decreased) in whole treated plants (Si, P, N Ca, B, K, Fe, and Zn). Thus from these data of nutrient amounts and concentrations, three groups of mineral elements can be determined (Figures II.1A and B):

**Group I elements:** includes nutrients significantly and positively affected in both amount (Figure II.1A) and concentration (Figure II.1B), suggesting that uptake was more stimulated than expected from the enhancement in plant growth. Group I includes Cu, Mn and Na in AZAL5 and HA7 treated plants, as well as S in AZAL5 and Mg in HA7 treated plants. As an example, in HA7 treated plants, the amount and concentration of S increased by 73.8% ( $\pm 7.9$ ) and 34.2% ( $\pm 6.1$ ), respectively. Similarly, the amounts of Cu, Mn and Na increased by 110.0% ( $\pm 8.3$ ), 111.7% ( $\pm 5.4$ ), 66.9% ( $\pm 5.0$ ) in AZAL5 treated plants and by 65.3% ( $\pm 3.1$ ), 132.7% ( $\pm 28.3$ ) and 213.5% ( $\pm 20.6$ ) in HA7 treated plants. Moreover, the Cu, Mn and Na concentrations also increased by 52.3% ( $\pm 6.0$ ), 53.3% ( $\pm 2.2$ ), 20.9% ( $\pm 3.6$ ), in AZAL5 treated plants and by 27.7% ( $\pm 2.4$ ), 79.8% ( $\pm 12.6$ ), 142.2% ( $\pm 15.9$ ) in response to HA7 treatment.

**Group II elements:** show an increase in their amounts (Figure II.1A) but without any significant difference in concentration (Figure II.1B). This group includes Si, N and P in AZAL5 and HA7 treated plants and B or Ca in response to



**Figure II.2: Relative shoot and root Fe amount and concentration in *Brassica napus* treated by AZAL5 or AH7 for 30 days.** The shoot and root Fe amount or concentration in control plants was equal to 1 and the relative Fe amounts (A) or concentrations (B) in shoots and roots of treated plants was obtained by comparison to control. Square: control; diamond: AZAL5 treated plants; triangle: AH7 treated plants. Vertical bars indicate  $\pm$  standard errors (for  $n=3$ ) of the mean. \* and † represent significant differences at  $p<0.05$  for AZAL5 and AH7, respectively



**Figure III.3: Accumulated nutrient amounts provided by nutrient solutions and plant uptake during the 30 days of the experiment.** White regions represent the Hoagland nutritive solution and the grey regions represent either AZAL5 (A) or HA7 (B). For each nutrient, the plain line and the hashed line correspond to uptake by control and treated plants, respectively. To make the figure clearer, the amounts of micronutrients were multiplied 10 fold for Na and Fe, and 100 fold for Si, ZN and Cu.

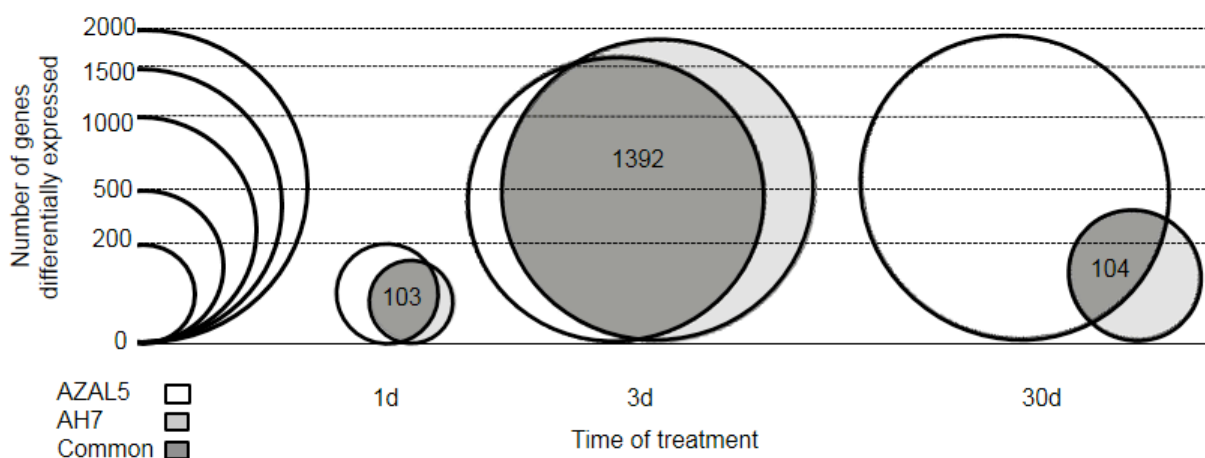


AZAL5 treatment. For example, compared to control plants, the N, P and Si amounts were increased (Figure II.1A) under both types of treatment (by 64.7% ( $\pm 6.8$ ), 49.5% ( $\pm 5.3$ ) and 114.6% ( $\pm 3.9$ ) in AZAL5 treated plants and by 57.3% ( $\pm 16.4$ ), 50.7% ( $\pm 9.8$ ) and 124% ( $\pm 24.0$ ) in HA7 treated plants) but their concentration stayed unchanged compared to control plants (Figure II.1B). From these data it can be suggested that following treatment, uptake of these group II elements was stimulated by the same order of magnitude as growth.

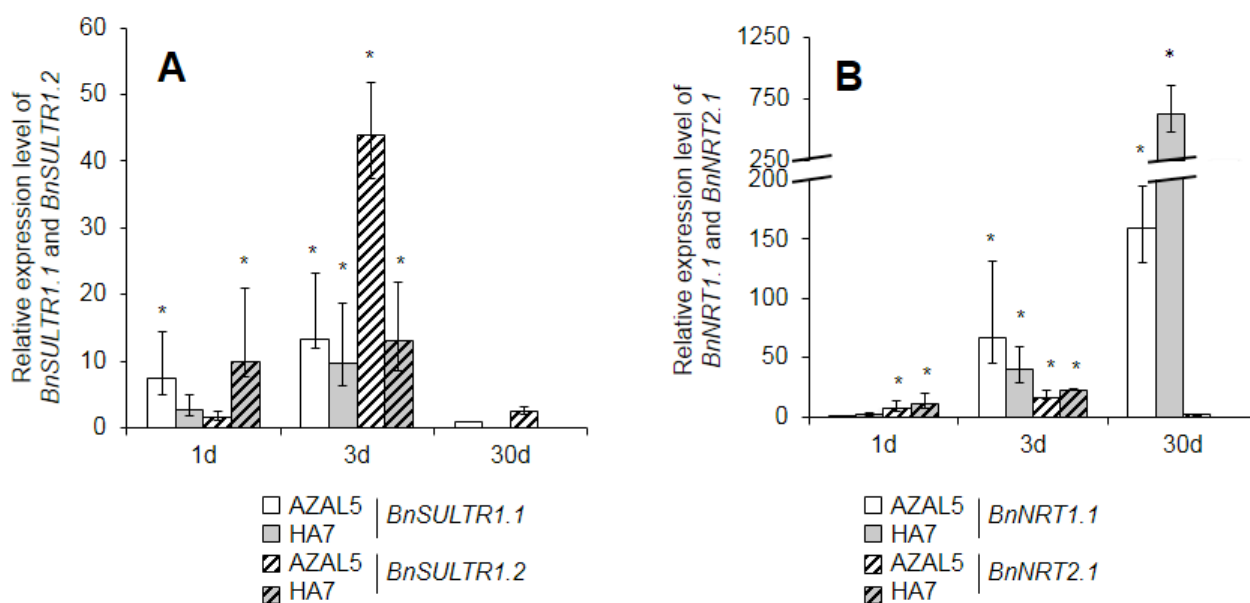
**Group III elements:** no significant difference was observed at the whole plant level for either the amount per plant or the concentration (for example, K, Zn and Fe in AZAL5 and HA7 treated plants but also B and Ca in HA7 treated plants). Within group III, Fe had shoot and root concentration patterns that were significantly different from control plants. Indeed, as presented in figure II.2, in response to HA7 treatment, the Fe concentration decreased in roots (-58.7%  $\pm 2.6$ ) but increased (+48.6%  $\pm 20.1$ ) in shoots. These data suggest that HA7 treatment induced a translocation of Fe from roots to shoots without any effect on the total amount of Fe in whole treated plants (Figure II.1A and B). Similar data were obtained for Zn in AZAL5 treated plants (data not shown).

### 3.3 Mineral composition of AZAL5 and HA7 extracts

Because of the complex composition of AZAL5 and HA7, we could initially postulate that these extracts were rich in some nutrients and enhanced the nutrient availability for treated plants. Indeed, as presented in Figure 3, both AZAL5 and HA7 treatments increased Na (by around 20%, Figure II.3A and B) and HA7 increased Si. Thus, over the 30d of the experiment and for each plant, 1606 mg of Na were provided by Hoagland solution, and in addition, about 415 and 434 mg of Na were provided by AZAL5 and HA7, respectively. In nutrient solution complemented by HA7 treatment, the Si amount rose by 1.5 fold, going up from 154 mg (Hoagland solution only) to 238 mg (Hoagland solution with HA7). Nevertheless, for all nutrients, the accumulated uptake was far below the amount supplied by the nutrient solution, with or without biostimulant. For example, the maximum accumulated uptake relative to total supply was found for N, with about 39.6% taken up in control plants (65.4% and 62.3% for AZAL5 and HA7 treated plants respectively). As a consequence, all nutrients were supplied in excess to the plant need, which led to the conclusion that mineral supplies from these two



**Figure III.4: Number of genes differentially expressed in *Brassica napus* after 1, 3 and 30 days of treatment with AZAL5 and/or AH7.** Genes differentially expressed (up and down-regulated) were selected according to the minimum change in relative expression of 5 folds in treated plants. White and grey circles indicate the number of genes differentially expressed in response to AZAL5 or AH7 treatment, respectively. Dark grey circles indicate the number of genes differentially expressed that were common to AZAL5 and AH7 treatment.



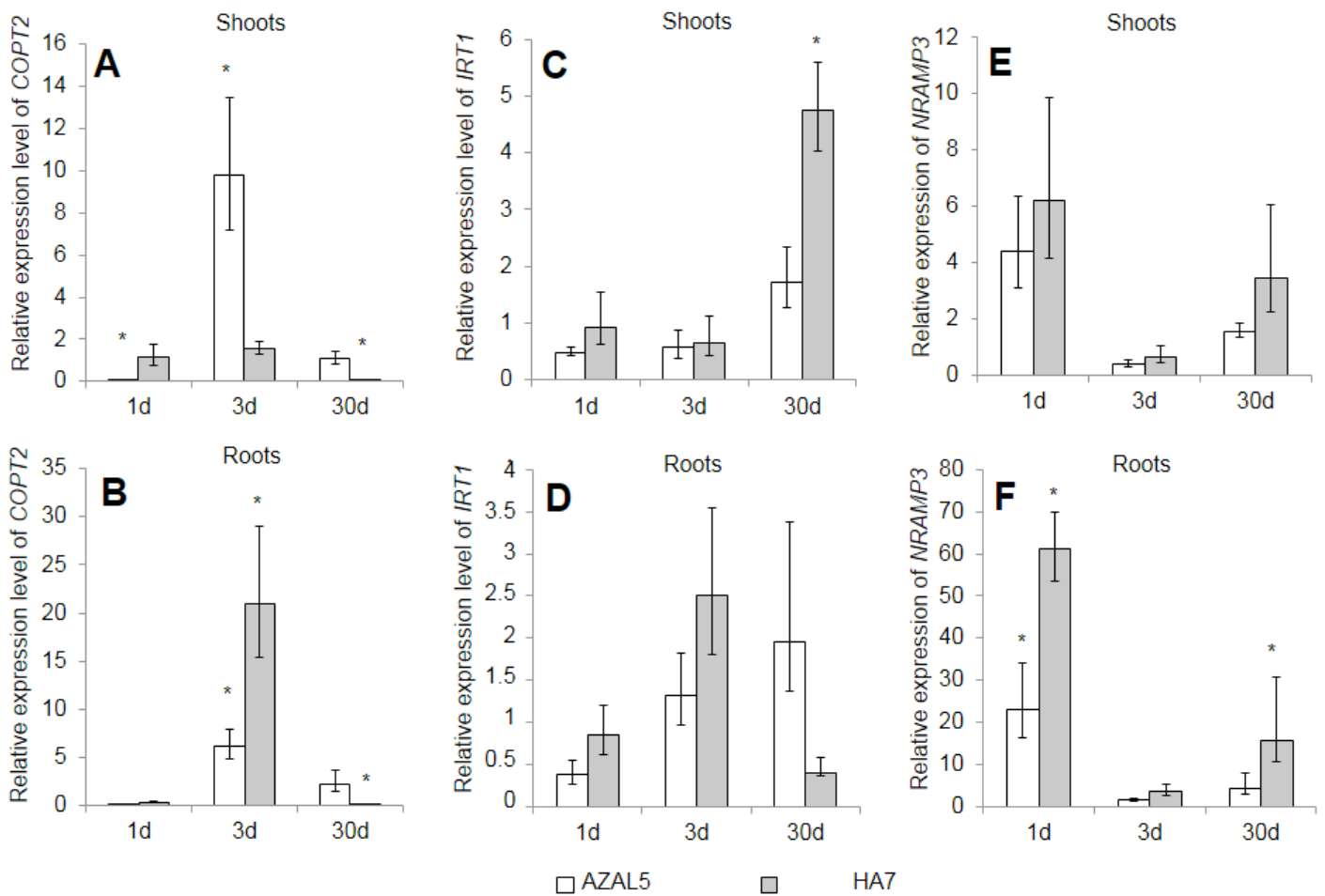
**Figure 5: Relative expression levels of genes encoding sulphate (*BnSULTR1.1* and *BnSULTR1.2*) and nitrate transporters (*BnNRT1.1* and *BnNRT2.1*) in shoots of *Brassica napus* treated with AZAL5 (white bars) and HA7 (grey bars) for 1, 3 and 30 days. **A:** Relative expression level of *BnSULTR1.1* (solid histogram) and *BnSULTR1.2* (hashed histogram). **B:** *BnNRT1.1* (solid histogram) and *NRT2.1* (hashed histogram). Histograms indicate the mean  $\pm$  standard error calculated using the formula  $|2^{-\Delta\Delta Ct} - 2^{-(\Delta\Delta Ct \pm SE)}|$  (for details, see material and methods section). For each gene and at each time, the expression level in control plants was equal to 1 (not shown).**

biostimulants were negligible. Thus, the increase in dry weight of treated rapeseeds did not result from an increase in nutrient availability.

### 3.4 Differentially expressed genes in response to AZAL5 and HA7 treatments

As an alternative to the previous hypothesis, it could be suggested that AZAL5 and HA7 extracts acted on plant metabolism and more specifically, on nutrient uptake and/or translocation. Global modifications of the metabolism of treated plants were found through microarray analysis (Figure II.4). For this analysis, genes with significantly different expression between control and treated plants (AZAL5 or HA7) were identified using a minimal fold change in expression of 5 (p-value <0.05). Because 30% of the 31 561 probes on the microarray chip were not annotated, over-expressed and under-expressed genes were treated similarly *i.e.* analysed as differentially expressed genes. Microarray analysis showed that after 1d of treatment, the differentially expressed genes numbered 200 in AZAL5 treated plants and 139 in HA7 treated plants, with 103 genes being common to both treatments (Figure II.4). After 3d, 1630 genes were up- or down-regulated with AZAL5 and 1771 with HA7, with 1392 genes being common to both sets of treated plants. After 30d of treatment, 1717 were differentially expressed with AZAL5 but only 164 of them were also differentially expressed with HA7, which represented half of the 318 genes differentially expressed with HA7.

Among the annotated probes on microarrays, the *BnNRT1.1* and *BnNRT1.2* genes encoding nitrate transporters and the *BnSULTR4.1* and *BnSULTR4.2* genes encoding sulphate transporters were up-regulated (data not shown). These results were confirmed by Q-PCR targeted to these genes in root tissue (Figure II.5A and B). In response to both treatments, the increase in the amount of N (Figure II.1A) was accompanied by an accumulation of N transporter transcripts (Figure II.5B). Indeed, compared to control, *BnNRT1.1* transcripts were accumulated at 3d ( $+45.0 \leq +67.4 \leq +132.1$ ) and 30d ( $+130.7 \leq +159.6 \leq +195.4$ ) in AZAL5 treated plants. In the same way, the *BnNRT1.1* gene was up-regulated at 3d by  $28.9 \leq 40.8 \leq 58.8$  fold and at 30d by  $486.8 \leq 630.9 \leq 857.4$  fold in roots with HA7 treatment. Only a small up-regulation of *BnNRT1.2* transcripts was observed at 1d and 3d in response to both treatments. Regarding the genes encoding S transporters (*BnSULTR1.1* and *BnSULTR1.2*), root expression patterns were different in AZAL5 and HA7 treated plants. Indeed, after 1d, the *BnSULTR1.1* gene was up-regulated only in AZAL5



**Figure 6: Relative expression level of genes encoding Cu (*COPT2*), Fe (*IRT1* and *NRAMP3*) and Zn (*NRAMP3*) transporters in shoots or roots of *Brassica napus* treated with AZAL5 (white bars) and HA7 (grey bars) for 1, 3 and 30 days. A and D *COPT2*. B and E *IRT1*. C and F. *NRAMP3*. Histograms indicate the mean  $\pm$  standard error calculated using the formula  $|2^{-\Delta\Delta Ct} - 2^{-(\Delta\Delta Ct \pm SE)}|$  (for details, see material and methods section). For each gene and at each time, the expression level in control plants was equal to 1 (not shown).**

treated plants ( $+5.0 \leq 7.5 \leq 14.4$ , Fig. 5A) while *BnSULTR1.2* transcripts were accumulated in HA7 treated plants alone ( $+7.7 \leq 9.9 \leq 21.0$ ). After 3d, transcripts of both genes encoding S transporters were accumulated in AZAL5 treated plants by  $12.02 \leq 13.4 \leq 23.2$  and  $37.8 \leq 44.0 \leq 51.9$  fold, respectively (and also with HA7 ( $+9.4 \leq 9.7 \leq 18.7$  and  $8.5 \leq 13.1 \leq 21.8$ , respectively)). After 30d of treatment, no significant difference in gene expression was observed, whatever the treatment or gene considered.

In addition to genes encoding N and S transporters, this study focused on genes encoding transporters of elements showing a concentration increase (group I) or a decrease in treated plants (Fe and Zn from group III), while the microarray chip did not contain any annotated probes for these genes of interest. For these transporter genes, specific Q-PCR primer sets were designed (Table 1). The relative expression was monitored for genes encoding  $Mg^{2+}$  (*MRS2-10*),  $Cu^{2+}$  (*COPT2*, Figure II.6A and D), and  $Fe^{2+}$  (*IRT1*, Figure II.6B and E) specific transporters as well as *NRAMP3*, which encodes a less specific transporter that is supposed to be involved in  $Fe^{2+}$  vacuolar efflux, as well as  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  efflux (Figure II.6C and F). Among group I elements, Cu was increased both in the amount per plant and concentration in AZAL5 and HA7 treated plants, as was the relative expression level of the Cu transporter, *COPT2* (Figure II.6A and D), in shoots and roots of treated plants. Compared to control plants, after 3d of treatment with AZAL5, *COPT2* transcripts were highly accumulated in shoots (Figure II.6A) and roots (Figure II.6D) by around 7 and 10 fold, respectively. This up-regulation was also found to a lesser extent after 30d in roots but not in shoots (down-regulated). In HA7 treated plants, the *COPT2* gene was also highly up-regulated (around 20 fold) in roots after 3 d before being down regulated after 30 days in shoots and roots (Figure II.6A and D). Magnesium was another mineral of group I that showed an increase both in terms of amount per plant ( $+105.2\% \pm 5.7$ ) and concentration ( $+48.6\% \pm 2.4$ ) in whole plants treated with AZAL5 but there was no change in the expression level of the *MRS2-10* gene (encoding a  $Mg^{2+}$  transporter, data not shown).

Alongside local variation in the concentration of group III elements (especially  $Fe^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  which were more efficiently translocated from roots to shoots), a significant up-regulation of *IRT1* gene transcripts was observed in HA7 shoots alone after 30d of treatment (Figure II.6B). Surprisingly, no difference occurred at any other time or under any other conditions, including AZAL5



treatment (Figure II.6B and E). However, analysis of the relative expression level of *NRAMP3*, encoding a generic  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  vacuolar efflux transporter, showed an up-regulation in roots as soon as 24h after beginning of both treatments (Figure II.6F) by  $16.3 \leq 23.1 \leq 34.1$  fold with AZAL5 and by  $53.5 \leq 61.1 \leq 69.7$  fold with HA7. At 3d and 30d, the *NRAMP3* expression level in roots was similar to control, except for HA7 at 30d, which showed a small increase. Compared to control plants, no significant difference in the level of *NRAMP3* expression was detected in shoots of plants treated by AZAL5 or HA7 (Figure II.6C).

#### 4. Discussion

Despite their different origins, both the AZAL5 and HA7 biostimulants improved root biomass production and increased the number of chloroplasts per leaf cell (table 2). The cross comparison of microarray results (Figure II.3) showed that more than 50% of differentially expressed genes were common to both biostimulants, except for AZAL5 after 30d of treatment. Only 9.6% of the AZAL5 differentially expressed genes were also affected by HA7, which was due to the significant decrease in the number of genes differentially expressed with HA7 from 3d (1771 genes) to 30d (only 318 genes). In AZAL5 there was a constant number of over or under-expressed genes after 3d (1630 genes) and 30 days (1717 genes). Results at early times of treatment are consistent with the similar effects of both treatments and the difference at 30d suggests that AZAL5 had a longer-term effect than HA7.

Because both treatments increased biomass production, a similar magnitude rise in all nutrients was expected in order to keep their concentrations at a similar level and prevent nutrient deficiencies in tissues. Among the nutrients monitored (Figure II.1), only group II elements (*i.e.* S, Ca and B with AZAL5, Mg with HA7, N and P in both sets of treated plants) follow this tendency. No further analysis was carried out on Ca, B and P as their increases per plant can be fully explained by plant growth stimulation.

On the other hand, group I elements (S with HA7, Mg with AZAL5, Mn, Cu and Na with AZAL5 or HA7) showed higher concentrations in treated plants than in control plants (Figure II.1) suggesting an up-regulation of their uptake. Consequently, the numbers of transcripts of the *SULTR1.1* and *SULTR1.2* S transporters, the *COPT2* Cu transporter and the *MRS2-10* Mg transporter were





monitored (Figure II.5B, 6A and 6D). The number of *MRS2-10* transcripts did not vary between treated plants and control, so it can be assumed that transcription regulation of this transporter was not involved in Mg accumulation. Alternatively, regulation of transcription of one of the 10 other members of the MRS family (Drummond *et al.*, 2006), and also post transcriptional or post translational regulation of these genes, could have been involved in Mg accumulation. As well as an increase in Cu concentrations (Figure II.1B), *COPT2* transcript levels were increased by both biostimulants in the short term and were down regulated after 30 days with HA7. Repression of *COPT2* transcription when the Cu concentration reaches high values is consistent with previous reports by del Pozo *et al.* (2010) that have described an early up-regulation of *COPT2* following Cu supply, which was followed in turn by a negative feedback to avoid the potential toxicity of high Cu accumulation. Similarly, the increase in S concentrations can be correlated with an up-regulation of S transporter genes after 3d of treatment with both treatments.

There were no differences in the uptake of Group III elements between treatments, but opposing variations in concentrations in roots and shoots were found for Fe and Zn suggesting an up-regulation of their root to shoot translocation with a steady state root uptake (Figure II.1). This is consistent with a constant level of *IRT1* transcripts in the roots (Figure II.6E) of HA7 and AZAL5 treated plants. On the other hand, the *NRAMP3* expression level was up regulated in roots as early as 24h after the beginning of the two treatments (Figure II.6F). This Fe vacuolar efflux transporter (Lanquar *et al.*, 2005) might be involved in Fe translocation from roots to the shoots in HA7 treated plants, leading to a reduction in the Fe concentration in roots (Figure II.2). Consequently Fe would be redistributed in shoots where the concentration increases, in order to keep Fe at a sufficient level for normal leaf metabolism despite the +23% increase in shoot biomass without any increase in Fe uptake. With AZAL5, neither the amount of Zn nor its concentration varied at the whole plant level, but the Zn concentration was reduced in roots. While no specific primers for Zn transporters could be designed, it must be pointed out that *NRAMP3* can also be involved in the transport of Zn (Puig and Peñarrubia, 2009), explaining an increased translocation from the roots to the shoots similar to Fe.

Interestingly, Cu, Mg, Zn and Fe are all of great importance for chloroplast metabolism because they are necessary for the synthesis of chlorophyll (containing  $Mg^{2+}$ ), Cu-Zn superoxide dismutase, the Fe-S cluster of ferredoxin, and many other



enzymes involved in electron transfer or protection against oxidative stress. It could be then assumed that the increase in their leaf concentrations resulting from higher uptake and/or translocation was linked to the higher number of chloroplasts induced by both treatments. Due to the high complexity of metal metabolism in plants (Clemens, 2002), the effects of AZAL5 or HA7 on nutrient concentrations probably involve a whole network of specific transporters (*COPT2*, *IRT1*) or more generic ones (such as *NRAMP3*) leading to the increase in group I concentrations in the plant or to a higher shoot translocation of Fe and Zn. Neither AZAL5 nor HA7 biostimulants possessed levels of hormones and/or nutrients sufficient to explain their effect on WOSR (Jannin *et al.* 2012a and 2012b, Figure II.3). Macromolecules such as polysaccharides (laminaran or fucoidan for example) from algal extracts (Khan *et al.*, 2009) or low molecular weight compounds from black peat (Quaggiotti *et al.*, 2004) are also commonly discussed as possible effectors. However, experiments using fractional analysis of similar extracts Beckett and van Staden (1989) showed that no fraction could exactly reproduce all the results from the original extract, suggesting that the overall biostimulation was due to a synergy of various compounds, each possibly acting at different levels of plant metabolism.

## 5. Conclusion

WOSR is very sensitive to nutrient deficiencies, especially N and S. Without changing WOSR nutrition significantly, both AZAL5 and HA7 made from natural raw materials stimulated plant growth and nutrient uptake or translocation. As a consequence, it could be suggested that AZAL5 and HA7 have a potential for S, Fe, Zn, Mg and Cu biofortification in WOSR. After 30d of treatment, Mg, Cu and S concentrations were increased at the whole plant level, suggesting an increased uptake that could be mediated by the increased expression levels of specific transporters such as *COPT2* for Cu and *SULTR1.1* and *SULTR1.2* for S. Moreover, the root-shoot balance was deregulated for Fe and Zn, with HA7 and AZAL5 increasing Fe and Zn translocation from roots to shoots alongside a concomitant over-expression of the *NRAMP3* gene. Overall, the data suggest that the use of biostimulants could be a novel strategy for plant biofortification.



## CHAPITRE 3 : Une déficience en cuivre chez *Brassica napus* induit une remobilisation du cuivre, une accumulation du molybdène et des modifications de l'expression de protéines plastidiales

---

### Avant-propos

La remobilisation du Cu lors d'une carence est la première à avoir été étudiée lors de ces travaux. Au cours de cette expérimentation, nous avons **estimé la remobilisation apparente** en analysant le contenu en Cu avant et après carence, par comparaison avec des plantes témoins non carencées. Nous avons également étudié différents marqueurs de sénescence tels que le contenu en RuBisCO, en N et en chlorophylle, afin **d'établir des liens éventuels entre les mécanismes de sénescence et la remobilisation du Cu.**

De plus, nous avons mesuré l'absorption relative de 12 autres éléments au cours de la carence, révélant une surprenante régulation positive de l'absorption du Mo. Nous avons également identifié les protéines dont l'expression est modulée dans les feuilles âgées en réponse à une carence en Cu. Enfin, lorsque cela nous a été possible, nous nous sommes efforcés d'identifier les perturbations métaboliques induites par la carence en Cu.

#### Résultats majeurs :

- **Le Cu est fortement remobilisé depuis les feuilles âgées de plantes carencées**
- **Le protéome de chloroplastes des feuilles mobilisatrices de Cu est fortement affecté par la carence en Cu**
- **En réponse à la carence en Cu, l'absorption du Mo est fortement augmentée (+120%) et associée à l'accumulation de transcrits d'transporteur racinaire de Mo(MOT1)**

Ce travail est présenté dans le chapitre suivant, sous la forme d'un article intitulé « Copper-deficiency in *Brassica napus* induces copper remobilization, molybdenum accumulation and modification of the expression of chloroplastic proteins. », accepté pour publication dans le journal PLOS One.



**Copper-deficiency in *Brassica napus* induces copper remobilization, molybdenum accumulation and modification of the expression of chloroplastic proteins.**

Vincent Billard<sup>1,2,3</sup>, Alain Ourry<sup>1,2,3</sup>, Anne Maillard<sup>1,2,3</sup>, Maria Garnica<sup>4</sup>, Laurent Coquet<sup>5</sup>, Thierry Jouenne<sup>5</sup>, Florence Cruz<sup>6</sup>, José-Maria Garcia-Mina<sup>4</sup>, Jean-Claude Yvin<sup>6</sup>, Philippe Etienne<sup>1,2,3,7</sup>,

1. Normandie Université, Caen, France
2. UNICAEN, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, Esplanade de la Paix, CS14032, 14032 Caen Cedex 5, France
3. INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, Esplanade de la Paix, CS14032, 14032 Caen Cedex 5, France
4. Timac Agro Spain, Poligono de Arazuri-Orcoyen Calle C n°32, 31160 Orcoyen, Spain
5. Plateforme de protéomique PISSARO, UMR6270 CNRS Faculté des Sciences de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France
6. Centre de Recherche International en Agrosience, CRIAS-TAI, Groupe Roullier, 55 boulevard Jules Verger, 35800 Dinard, France
7. Corresponding author: philippe.etienne@unicaen.fr, phone: +33 231 565 374, fax: +33 231 565 360.

### Keywords

Copper mobilization, ionic, molybdenum and copper transporters





## Abstract

During the last 40 years crop breeding has strongly increased yields but has had adverse effects on the content of micronutrients, such as Fe, Mg, Zn and Cu in edible products despite their sufficient supply in most soils. This suggests that micronutrient remobilization to edible tissues has been negatively selected. As a consequence, the aim of this work was to quantify the remobilization of Cu in leaves of *Brassica napus* L. during Cu deficiency and to identify the main metabolic processes that were affected so that improvements can be achieved in the future. While Cu deficiency reduced oilseed rape growth by less than 19% compared to control plants, Cu content in old leaves decreased by 61.4%, thus demonstrating a remobilization process between leaves. Cu deficiency also triggered an increase in Cu transporter expression in roots (*COPT2*) and leaves (*HMA1*), and more surprisingly, the induction of the *MOT1* gene encoding a molybdenum transporter associated with a strong increase in molybdenum (Mo) uptake. Proteomic analysis of leaves revealed 33 proteins differentially regulated by Cu deficiency, amongst which more than half were located in chloroplasts. Eleven differentially expressed proteins are known to require Cu for their synthesis and/or activity. Enzymes that were located directly upstream or downstream of Cu-dependent enzymes were also differentially expressed. The overall results are then discussed in relation to remobilization of Cu, the interaction between Mo and Cu that occurs through the synthesis pathway of Mo cofactor, and finally their putative regulation within the Calvin cycle and the chloroplastic electron transport chain.

## Abbreviations

DW: Dry Weight, IRMS: Isotope-Ratio Mass Spectrometry, ICP-OES: Inductively coupled plasma optical emission spectrometry, RT: Reverse transcription, Q-PCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction, TPI: Triose Phosphate Isomerase, RuBisCO: Ribulose-1,5-BISphosphate Carboxylase/Oxygenase, GAP: GlycerAldehyde-3-Phosphate, GAPDH: GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase, OEE: Oxygen Evolving Enhancer, PGK: PhosphoGlucoKinase, FBPase: Fructose 1-6 BisPhosphatase, R5P: Ribulose-5-Phosphate, X5P: Xylose-5-Phosphate, GSA: Glutamate-1-Semialdehyde 2,1-Aminomutase.



## 1 Introduction

While N, P, K and more recently S fertilization are common practices in agriculture, the supply of micronutrients is less frequently considered. However, according to the World Health Organization (Allen *et al.*, 2006), two billion people around the world suffer from micronutrient deficiencies (mostly Fe, Cu, Zn and Mg), causing 7.3 % of disease burden. Among the micronutrients involved in human metabolism, Cu deficiency, for example, causes symptoms of diseases such as immune defects or anaemia (Collins and Klevay, 2011). Without stock or sufficient intake, undernourished children are the first affected (Steinnes, 2009), however Cu deficiency is also observed in developed countries (Ruston *et al.*, 2004 ; White and Broadley, 2005). In the human diet, Cu is mainly present in meat (especially liver and offal), fish and nuts (ANSES, 2012). However, these food supplies are not available to most populations suffering from micronutrients deficiencies. As a consequence, for these populations staple foods (cereals, tubers and oils) must be fortified in order to provide the minimum dose of essential micronutrients such as Cu (Bouis, 2012).

Over the past 60 years, the micronutrient content (mostly Fe, Zn, Mg and Cu) has been reduced in edible products despite sufficient micronutrient availability in most cultivated soils, and this is the result of varietal selection that aimed to achieve higher yields (Fan *et al.*, 2008 ; Garvin *et al.*, 2006). Consequently, whether a genetic improvement in root micronutrient uptake would increase the edible plant content remains questionable. Alternatively, improving the transfer of such micronutrients in edible parts from remobilization of vegetative tissue could be an alternative for breeding if we assume that the recycling (i.e. remobilization) of such nutrients is a significant process. In addition, it has been shown that some soils can lack Cu resulting in dramatic agricultural effects (Peverill *et al.*, 1999). Thus, Cu deficiency in plants affects human health either directly (decrease in yield) or indirectly (symptoms induced by a lack of micronutrients) (Alloway, 2013 ; Andersen, 2007).

As a transition metal (Yruela, 2013), Cu is involved in numerous processes in plants. Most of Cu's functions in plants rely on enzymatically bound Cu (more than one hundred proteins identified so far (Yruela, 2009)), mostly catalysing redox



reactions. As a consequence, only 2% of plant Cu occurs in its free form. Chloroplasts contain about half of the total plant Cu, where it is especially associated with proteins involved in the electron transport chain such as plastocyanin (Hänsch and Mendel, 2009). Three Cu ions are also required for assembly of the active cytochrome c oxidase complex in the mitochondrial electron transport chain. Additionally, numerous proteins known to bind Cu or to be regulated by Cu are involved in the Calvin cycle or in the Tricarboxylic Acid Cycle (TCA), for example Fructose 1-6 Bis Phosphatase (FBPase), Glyceraldehyde 3 Phosphate DeHydrogenase (G3PDH) (Tan *et al.*, 2010) and PhosphoGlycerate Kinase (PGK) (Bailey *et al.*, 1968). Cu is also important for enzymes involved in cell detoxification, such as glutathione-S-transferase (Kung *et al.*, 2006) or Cu-Zn superoxide dismutase (Tainer *et al.*, 1983), or in cell wall metabolism such as ascorbate and polyphenol oxidases (Broadley *et al.*, 2012).

From a genetic point of view, some studies have reported a high variation in Cu content between accessions of the same species such as spinach, pea (Grusak and Cakmak, 2005) and cassava (Chavez *et al.*, 2000). For example, among *Brassica oleracea* genotypes, shoot Cu concentrations can vary up to fivefold (White and Broadley, unpublished). While it has been suggested that Cu management should be easily improved by breeding (White and Broadley, 2005), mechanisms that could increase the Cu content in edible tissues, such as remobilization, have been poorly described in the literature.

An important agricultural crop, such as *Brassica napus*, usually requires high levels of nutrients and hence fertilization to reach an optimal yield with preserved quality. Indeed, winter oilseed rape is highly sensitive to sulphur (S) and nitrogen (N) deficiencies with negative consequences for yield and seed quality (Dubousset *et al.*, 2010) and therefore, requires high doses of N and S fertilizers. These strong needs for fertilizers are partly due to the low (macro)-nutrient use efficiency (defined by the ratio of seed to plant nutrient contents) of oilseed rape. For example, it has been reported that its low N use efficiency results from a relatively inefficient endogenous N mobilization (Desclos *et al.*, 2008 ; Etienne *et al.*, 2007) that occurs mostly during leaf senescence (Avice and Etienne, 2014). In contrast, S remobilization from leaves to the seeds (linked to induction of tonoplastic sulphate transporters allowing the mobilization of sulphate previously stored in leaves (Abdallah *et al.*, 2010)) is not triggered by leaf senescence but rather by S



deficiency. Therefore, without S deficiency, the S content in fallen leaves remains high, up to 2 % of dry weight. According to these studies, *Brassica napus* constitutes an important model of defective agro-environmental interactions in studies of nutrient remobilization from leaves. Moreover, it constitutes a relevant plant species model because its genetic proximity to *Arabidopsis thaliana* provides easy access to molecular tools while maintaining an agronomic relevance.

To date, deciphering of the plant response to Cu deficiency has been performed through Fe and Zn interactions, identification and characterization of genes encoding transporters (such as *COPT* and *HMA* families), and monitoring target proteins and metabolites (Deng *et al.*, 2013 ; Garcia-Molina *et al.*, 2013 ; Higashi *et al.*, 2013 ; Waters and Armbrust, 2013). However, to our knowledge, the effect of Cu deficiency on growth and plant metabolism is currently poorly reported. Indeed, only one article (Wintz *et al.*, 2003) describes the use of a microarray approach to study modifications of the *Arabidopsis thaliana* transcriptome in response to Cu deficiency.

The first aim of this study was to quantify the effect of Cu deficiency on growth of *Brassica napus* and to assess the mobility of Cu between plant tissues (i.e. Cu remobilization). Moreover, a wider analysis of plant nutrients has been used to monitor the effect of Cu-deficiency on the uptake of some macro (Ca, K, Mg, N, P and S) and micronutrients (B, Fe, Mn, Mo, Na and Zn). Finally, a molecular approach combining proteomic and targeted transcriptomic studies has been used to identify the main metabolic pathways affected by Cu deficiency.

## 2. Material and methods

### 2.1 Growth conditions

Seeds of *Brassica napus* var. Boheme were surface-sterilized by exposure to 80 % ethanol for 30 s followed by 20 % sodium hypochlorite for 10 min. After 10 washes with demineralised water, seeds were germinated on perlite over demineralised water for 2 days in the dark and 1 week under natural light in a greenhouse. Just after first leaf emergence, seedlings were transferred to a 20 L tank containing the following nutrient solution: KNO<sub>3</sub> 1.25 mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 1.25 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.25 mM, MgSO<sub>4</sub> 0.5 mM, EDTA, 2 NaFe 0.2 mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.01 mM, MnSO<sub>4</sub> 5 µM, ZnSO<sub>4</sub> 3 µM, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 0.7 µM, CoCl<sub>2</sub> 0.1 µM, NiCl<sub>2</sub> 0.04 µM,





SiO<sub>2</sub> 0.1 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 1.25 mM, KCl 0.25 mM. Control nutrient solution also contained NaOH 0.1 mM and CuSO<sub>4</sub> 0.7 μM while Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 μM was added to Cu-depleted nutrient solution. These nutrient solutions were renewed every two days. Plants were grown under greenhouse conditions with a thermoperiod of 20°C/17°C day/night and a photoperiod of 16 h. Natural light was supplemented with high pressure sodium lamps (Philips, MASTER GreenPower T400W) supplying an average photosynthetically active radiation of 280 μmol photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> at canopy height. After one week of growth, plants were separated into 2 sets: control plants receiving normal nutrient solution and Cu-deficient plants receiving the Cu-depleted nutrient solution (for details, see above) over 25 days. Four independent samples, each consisting of three plants, were harvested at the beginning of Cu depletion (t=0) and after 25 days with (control) or without Cu (-Cu). Leaves and petioles present at the beginning of Cu depletion (referred as “old leaves” and “old petioles”, respectively) were distinguished from leaves appearing during Cu depletion (referred as “young leaves” and “young petioles”, respectively). At each date of harvest (t=0 and t=25 days), whole roots from control and Cu-depleted plants were collected. An aliquot of each tissue was weighed and dried in an oven (60°C) for dry weight (DW) determination and ground to fine powder for IRMS and ICP-OES analysis. Thereafter, the remaining fresh tissues were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for transcriptomic and proteomic analyses.

Every five days throughout the culture period, non-destructive determination of chlorophyll content of young and old leaves was performed using a SPAD chlorophyll meter (SPAD-502 model, Minolta, Tokyo, Japan). The determination was carried using three replicates of ten measurements performed on independent leaves.

## 2.2 Analysis of nutrients in plant tissues.

For the analysis of total N and S contents, an aliquot of around 4 mg DW of each plant organ sample was placed in tin capsules for total N and S analysis using an IRMS spectrometer (Isoprime, GV Instrument, Manchester, UK) linked to a C/N/S analyser (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy). The total amount of N or S (N<sub>tot</sub> or S<sub>tot</sub>) in a tissue “i” at a given time “t” is calculated:

$$N_{tot} \text{ (or } S_{tot}) = \% N_{i,t} \text{ (or } S_{i,t}) \times DW_{i,t} / 100$$

Other nutrients (K, Ca, S, P, Mg, Fe, Na, Mn, B, Si, Zn and Cu) were analysed by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES, Thermo

**Table III.1: Q-PCR primer sets.** *EF1 $\alpha$*  and *18S rRNA* were housekeeping genes used for relative gene expressions by Q-PCR analysis. *EF1 $\alpha$*  and *18S rRNA* were s housekeeping genes used for relative gene expressions by Q-PCR analysis.

Gene	Accession number	Forward	Reverse	Gene Function
<i>EF1-<math>\alpha</math></i>	DQ312264	5'-gcctggtatggttgacct-3'	5'-gaagtagcagcacccttg-3'	
<i>18S rRNA</i>	GQ380689	5'-cggataaccgtagtaattctag-3'	5'-gtactcattccaattaccagac-3'	
COPT2	NM_114557	5'-tgcacatgacctctttgg-3'	5'-gtcatcggagggtttgga-3'	Cu uptake
HMA1	NM_119890.6	5'-gtacagctgaccgaggaagc-3'	5'tgccataaatgggttcaat-3'	Cu allocation to chloroplast
MOT1	NM_128127	5'-ctgccaggatttgactta-3'	5'agatccccaacacgaacaag-3'	Mo uptake

Elemental Co. Iris Intrepid II XDL) with prior microwave acid sample digestion (8 mL of concentrated HNO<sub>3</sub> and 2 mL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 0.5 g DW), using a protocol previously described by Mora *et al.* (Mora *et al.*, 2010).

### 2.3 RNA extraction

Total RNA was extracted from 200 mg of frozen samples ground to a powder with a pestle in a mortar containing liquid nitrogen. The resulting powder was suspended in 750 µl of extraction buffer [0.1 M TRIS, 0.1 M LiCl, 0.01 M EDTA, 1 % SDS (w/v), pH 8] and 750 µl of hot phenol (80°C, pH 4). This mixture was vortexed for 30 s and, after addition of 750 µl of chloroform/isoamylalcohol (24:1, v/v), the homogenate was centrifuged (15 000 g, 5 min, 4°C). The supernatant was transferred into a 4 M LiCl solution and incubated overnight at 4°C. After centrifugation (15 000 g, 30 min, 4°C), the pellet was suspended in 100 µl of sterile water. RNA was then purified with an RNeasy mini kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen, Courtaboeuf, France). Quantification of total RNA was performed by spectrophotometry at 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq, France) before Reverse Transcription (RT) and real time Quantitative Polymerase Chain Reaction (Q-PCR) analysis.

### 2.4 Reverse transcription (RT) and Q-PCR analysis

For RT, 1 µg of total RNA was converted to cDNA with an "iScript cDNA synthesis kit" according to the manufacturer's protocol (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). Q-PCR amplifications were performed using specific primers for each housekeeping gene (*EF1-α* and *18S rRNA*) and target genes (Table III.1). Q-PCRs were performed with 4 µl of 200x diluted cDNA, 500 nM of primers, and 1x SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) in a real-time thermocycler (CFX96 Real Time System, Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). A 2 step program, composed of 42 cycles of a denaturing step at 95°C for 15 s followed by an annealing and extending step at 60°C for 40 s, was used for all pairs of primers (Table III.1) except for *COPT2*, for which we used a 3 step program. In this case the denaturing step was as described previously. Annealing was at 58.6°C for 10 s and was followed by an extending step at 72°C for 30 s. For each pair of primers, a threshold value and PCR efficiency were determined using a cDNA preparation diluted >10-fold. For all pairs of primers, PCR efficiency was around 100 %. The specificity of PCR amplification was examined by monitoring the presence of the single peak in the melting curves after Q-PCRs and by



sequencing the Q-PCR product to confirm that the correct amplicon was produced from each pair of primers (Eurofins, Ebersberg, Germany). The relative expression of the genes in each sample was compared with the control sample [corresponding to untreated plants at the same time of harvest] and was determined with the delta delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) method using the following equation (Livak and Schmittgen, 2001):

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

with  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{treated}} - \Delta Ct_{\text{control}}$  and with  $\Delta Ct = Ct_{\text{target gene}} - [\sqrt{(Ct_{EF1-\alpha} \times Ct_{18S rRNA})}]$

Where Ct refers to the threshold cycle determined for each gene in the exponential phase of PCR amplification and  $[\sqrt{(Ct_{EF1-\alpha} \times Ct_{18S rRNA})}]$  corresponds to the geometric average of Ct of the reference genes. Using this analysis method, the relative expression of the different genes in the control sample of the experiment was equal to 1 (Livak and Schmittgen, 2001), and on this basis the relative expression of other treatments was then compared with the control. For *COPT2*, because no transcript was detected in control plants (*i.e.*  $Ct_{\text{control}}$  is undetermined), values are not expressed relatively to control but as  $2^{-\Delta Ct}$ .

## 2.5 Extraction and determination of total proteins

Two hundred mg of fresh matter from old leaf samples were ground to a fine powder in liquid nitrogen in the presence of 50 mg of poly(vinylpyrrolidone) (PVPP). The addition of PVPP is used to fix plant polyphenols that might interfere with the quantification of proteins or during separation of proteins by electrophoresis. The ground material was dissolved in 1.75 mL of TCA/acetone solution (10 % TCA (w/v) prepared in acetone). After centrifugation (3 min, 16 000 g, 4°C), the protein pellet was purified according to the protocol adapted from Wang *et al.* (Wang *et al.*, 2003). The protein pellet obtained after precipitation with TCA/acetone (10 % TCA (w/v)) was suspended in 1.75 mL of 0.1 M ammonium acetate dissolved in 80 % methanol. After homogenization and centrifugation (16 000 g, 3 min, 4°C), the pellet was washed with 1.75 mL of 80 % acetone and centrifuged again (16 000 g, 3 min, 4°C). The supernatant was removed and the pellet was dried under vacuum (Speedvac Concentrator 5301, Eppendorf, France) for 5 min at 50°C and then suspended with 0.8 mL of phenol at pH 7.9 and in 0.8 mL of dense SDS buffer (30 % sucrose, 2 % SDS, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 % 2-mercaptoethanol). After 5 min incubation at 4°C and centrifugation (16 000 g, 3 min, 4°C), the phenol phase was transferred to a new tube and supplemented with



1.75 mL of 0.1 M ammonium acetate and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  overnight. Afterwards, ammonium acetate was used to precipitate proteins to enable their collection by centrifugation (16 000 g, 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). The protein pellet was then washed with 1.75 mL of 100 % methanol and again with 1.75 mL of 80 % acetone. Residual acetone was removed by vacuum evaporation over a few minutes. The pellet was resuspended in 400  $\mu\text{L}$  of R2D2 rehydration buffer [5 M urea, 2 M thiourea, 2 % CHAPS, 2 % N-decyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate, 20 mM dithiothreitol, 5 mM Tris (2-carboxy-ethyl) phosphine, 0.5 % IPG buffer] (GE Healthcare, Saclay, France), pH 4 to 7 (Méchin *et al.*, 2003). The total protein concentration was determined by the method previously described by Bradford (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as standard.

## 2.6 Two-dimensional electrophoresis (2-DE) and image analysis

2-DE was performed according to the protocol detailed by Desclos *et al.* (Desclos *et al.*, 2008). Gels were stained using the silver-staining procedure described by Blum *et al.* (Blum *et al.*, 1987) and scanned with a ProXPRESS 2D proteomic imaging system (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France). Images of the 2-DE gels were analysed using the Progenesis SameSpots software v3.0 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) according to the manufacturer's protocol. Gels from three independent biological replicates were used. Spot detection, warping, and matching were performed automatically by the software and manually validated. Artefacts due to non-specific silver nitrate staining or spots that could not be confidently verified as true matches were disregarded rather than manually edited, and misalignments were corrected by manual warping when appropriate. Mw and *pI* were calculated using SameSpots software calibrated with commercial molecular mass standards (prestained precision protein standards ; Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) run in a separate marker lane on 2-DE gel.

## 2.7 RuBisCO relative quantification

In order to observe maximum spots, silver staining was performed on 2-DE with a saturated RuBisCO signal. The amount of RuBisCO was then measured by Experion Pro260 Analysis Kit (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). The Experion automated electrophoresis system applies a combination of microfluidic separation technology and sensitive fluorescent detection of proteins. (Bradová and Matějová, 2008) The protein extracts were treated with the Experion reagents and then separated on the Experion automated electrophoresis station according to the





manufacturer's instruction. Peak areas corresponding to large and small RuBisCO subunits were then compared manually using software given by manufacturer.

## 2.8 Protein Identification by ESI LC–MS/MS.

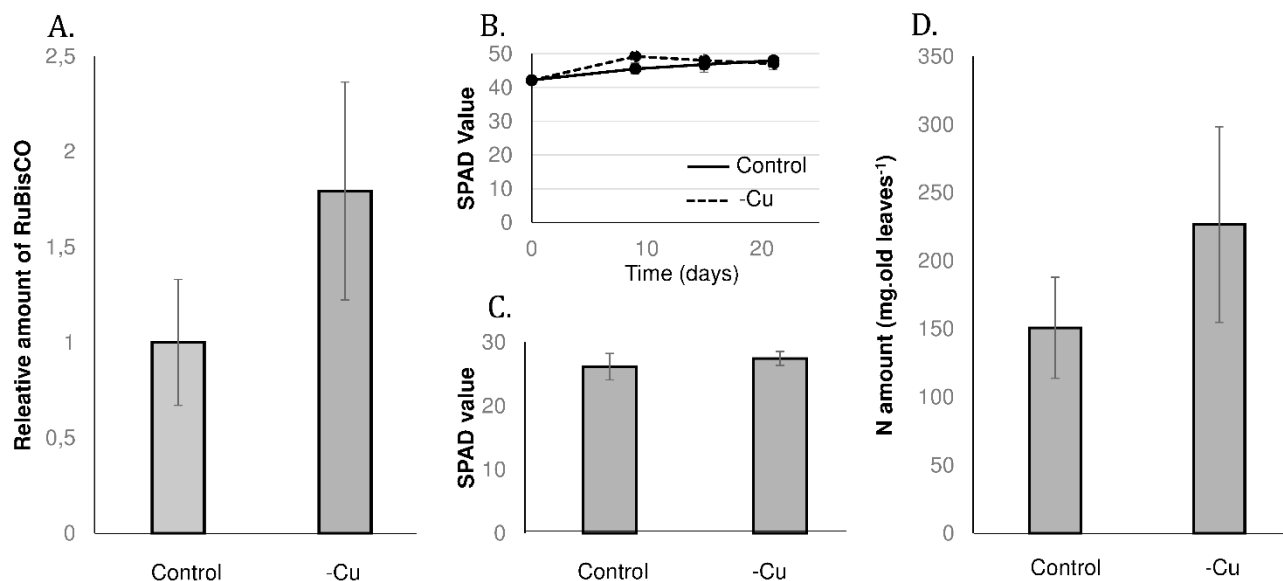
Spots of interest were excised from 2D gels and washed several times with water and dried for a few minutes. Trypsin digestion was performed overnight with a dedicated automated system (MultiPROBE II, Perkin-Elmer). The gel fragments were subsequently incubated twice for 15 min in a 0.1 % CH<sub>3</sub>CN solution in water to allow extraction of peptides from the gel pieces. Peptide extracts were then dried and dissolved in starting buffer for chromatographic elution, consisting of 3 % CH<sub>3</sub>CN and 0.1 % HCOOH in water. Peptides were enriched and separated using lab-on-a-chip technology (Agilent, Massy, France) and fragmented using an on-line XCT mass spectrometer (Agilent). The ESI LC–MS/MS data were converted into DTA– format files that were further searched for proteins with MASCOT Daemon (Matrix science). For protein identification, two strategies were employed to mine the maximum data. Measured peptides were searched in the NCBI nr–protein sequence database, *viridiplantae* (green plants, NCBI Reference Sequence Database), and in the *Brassica* EST database (*Brassica* Genome Gateway (2007)). Proteins with two or more unique peptides matching the protein sequence with a score >53, as defined by MASCOT, were considered as a positive identification. The spectra of each peptide were verified manually. In cases where protein identification data were lacking, BLAST analysis was performed (“BLAST: Basic Local Alignment Search Tool,”).

## 2.9 Data and statistical analysis

Regarding the growth, ICP-OES and IRMS analyses, all experiments were conducted with 4 independent biological replicates each corresponding to 3 plants. Proteomics and Q-PCR analyses were performed on 3 independent biological replicates each corresponding to 3 plants. Data are given as mean ±SE for n=3 or 4. For Q-PCR, SE and Student's T-test were based on  $\Delta\Delta C_t$  (or  $\Delta C_t$  for *COPT2*, see above for more information), when the relation between values is still linear. According to Yuan *et al.* 2006 (Yuan *et al.*, 2006), a confidence interval of each mean value (with min and max values) can be calculated and has been presented in the results section as [mean of relative expression] (Min value - Max value ) with Min value =  $2^{-(\Delta\Delta C_t + SE)}$  and Max value =  $2^{-(\Delta\Delta C_t - SE)}$  (Min value =  $2^{-(\Delta C_t + SE)}$  and Max value =  $2^{-(\Delta C_t - SE)}$  for *COPT2*). Conversion of the results of an exponential process

**Table III.2: Biomass and Cu content in *Brassica napus* L. at t=0 and after 25 days of culture with (control) or without Cu (-Cu). \* and † represent significant differences at p<0.05 compared to t=0 and control, respectively. NA: Not Applicable.**

		t=0	Control (25d)	-Cu (25d)
Old leaves	DW (g)	2.13±0.17	4.78±0.79	4.83±0.93
	Cu amount (µg)	12.2±1.1	17.0±2.5	4.7±1.0*†
	% remobilized	NA	NA	60.36±4,15
Old petioles	DW (g)	0.63±0.04	8.07±0.60	6.31±0.49*†
	Cu amount (µg)	2.1±0.2	20.3±2.4*	8.0±0.7*†
Young leaves	DW (g)	NA	12.7±0.94	8.83±1.64
	Cu amount (µg)	NA	76.2±4.8	16.2±2.3 †
Young petioles	DW (g)	NA	10.02±0.78	8.66±0.55
	Cu amount (µg)	NA	11.8±1.9	2.6±0.7 †
Roots	DW (g)	0.48±0.03	4.11±0.23*	3.73±0.06*
	Cu amount (µg)	14.7±3.0	155.2±13.2*	43.4±1.5*†
Total	DW (g)	3.23±0.24	39.67±1.26*	32.37±1.71*†
	Cu amount (µg)	29.0±4.0	280.5±13.5*	74.8±3.0*†



**Figure III.1: Parameters associated with senescence. (A.)** Relative amount of RuBisCO in old leaves. Relative chlorophyll content (SPAD value) during (B.) the whole experiment at whole plant level and (C.) after 25 days of depletion in old leaves (D.) N content in old leaves.

into a linear comparison of amounts leads to an asymmetric distribution (Livak and Schmittgen, 2001).

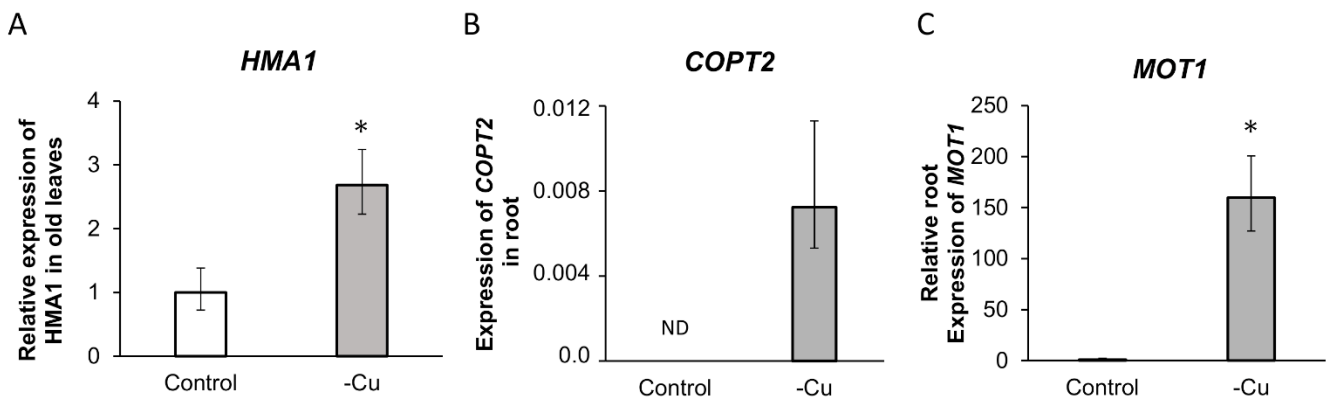
All data were analysed with Student's T-test ( $p < 0.05$ ) and marked by an asterisk (\*) or cross (†) when significantly different.

### 3. Results

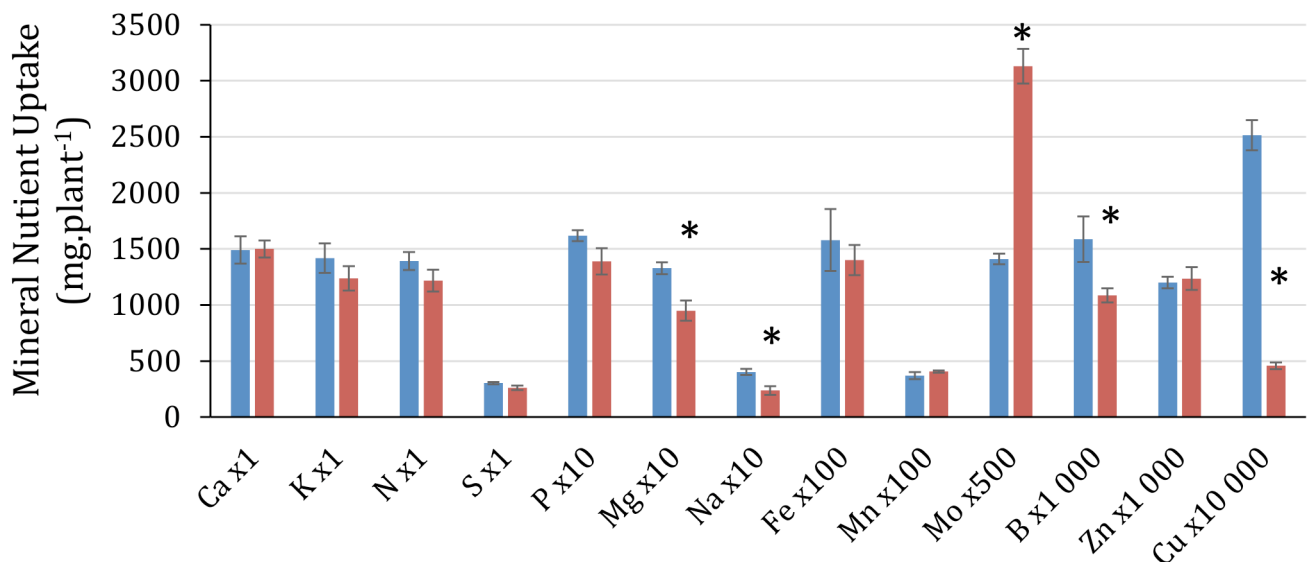
#### 3.1 Cu depletion affects the growth and Cu content of *B. napus*

After 25 days of culture, control whole plant DW increased from  $3.23 \pm 0.24$  g to  $39.67 \pm 1.26$  g (Table III.2). The total DW of Cu-depleted plants was decreased by 18.4 % relative to control plants (Table III.2, from 39.67 to  $32.37$  g DW.plant<sup>-1</sup>). This was the result of a significant reduction in root DW (from  $4.11 \pm 0.23$  in control plants to  $3.73 \pm 0.06$  g DW.plant<sup>-1</sup> in Cu-depleted plants) and secondly, of old petioles DW (from  $8.07 \pm 0.60$  to  $6.31 \pm 0.49$  g DW.plant<sup>-1</sup>). No significant differences in growth rates were found for other organs. Control plants accumulated 251.5 µg of Cu while the Cu content in Cu-depleted plants only rose from  $29.0 \pm 4.0$  µg to  $74.8 \pm 3$  µg. The slight increase in total Cu in Cu-depleted plants was the result of a trace of Cu found in the mineralized water used for the nutrient solution ( $0.47 \pm 0.00$  µM, data not shown). In roots of control plants, the amount of Cu increased from  $14.7 \pm 3.0$  µg to  $155.2 \pm 13.2$  µg but only reached  $43.4 \pm 1.5$  µg in Cu deficient plants. In aerial tissues that developed under Cu depletion, the Cu amount was reduced from  $11.8 \pm 1.9$  µg to  $2.6 \pm 0.7$  µg and from  $76.2 \pm 4.8$  µg to  $16.2 \pm 2.3$  µg in petioles and leaves, respectively. In petioles already present at the time of the Cu depletion, the amount of Cu rose from  $2.1 \pm 0.2$  µg to  $8.0 \pm 0.7$  µg during depletion while it reached  $20.3 \pm 2.4$  µg in control plants at the end of the experiment. The amount of Cu in old leaves of control plants did not vary significantly during the experiment, while in Cu-depleted plants, it was reduced from  $12.2 \pm 1.1$  µg to  $4.7 \pm 1.0$  µg indicating a remobilization of  $61.4 \pm 4.2$  % of the Cu initially present in these leaves.

No significant difference was observed for RuBisCO by *Experion*<sup>TM</sup> method (Figure III.1.A). During the whole experiment, the leaf chlorophyll content (SPAD values, Figure III.1.B) were not significantly different between control and Cu-depleted plants. At the end of the experiment, this was confirmed in old leaves (Figure



**Figure III.2: Relative accumulation of transcript of Cu transporters (A. *HMA1* in old leaves and B. *COPT2* in roots) and Molybdenum transporter 1 (C. *MOT1* in roots) in *Brassica napus* L after 25 days of culture with (control) or without Cu (-Cu). Control is represented by white bars and -Cu by grey bars. *MOT1* and *HMA1* values are expressed as  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  while *COPT2* value is expressed as  $2^{-\Delta C_t}$  (for details, see “Material and Methods”). \* represents significant differences at  $p < 0.05$ . ND: not detected.**



**Figure III.3: Mineral nutrient uptake in control plants (blue) and Cu-depleted plants over 25 Days (red). Due to large differences between nutrients, factors have been attributed to each nutrient to allow representation on the same graph. \* indicates significant difference between control and Cu depleted plants at  $p = 0.05$**

III.1C). Also, N content in old leaves didn't present any difference between the two conditions (Figure III.1D).

### 3.2 Cu depletion increases expression of Cu transporters in *Brassica napus*

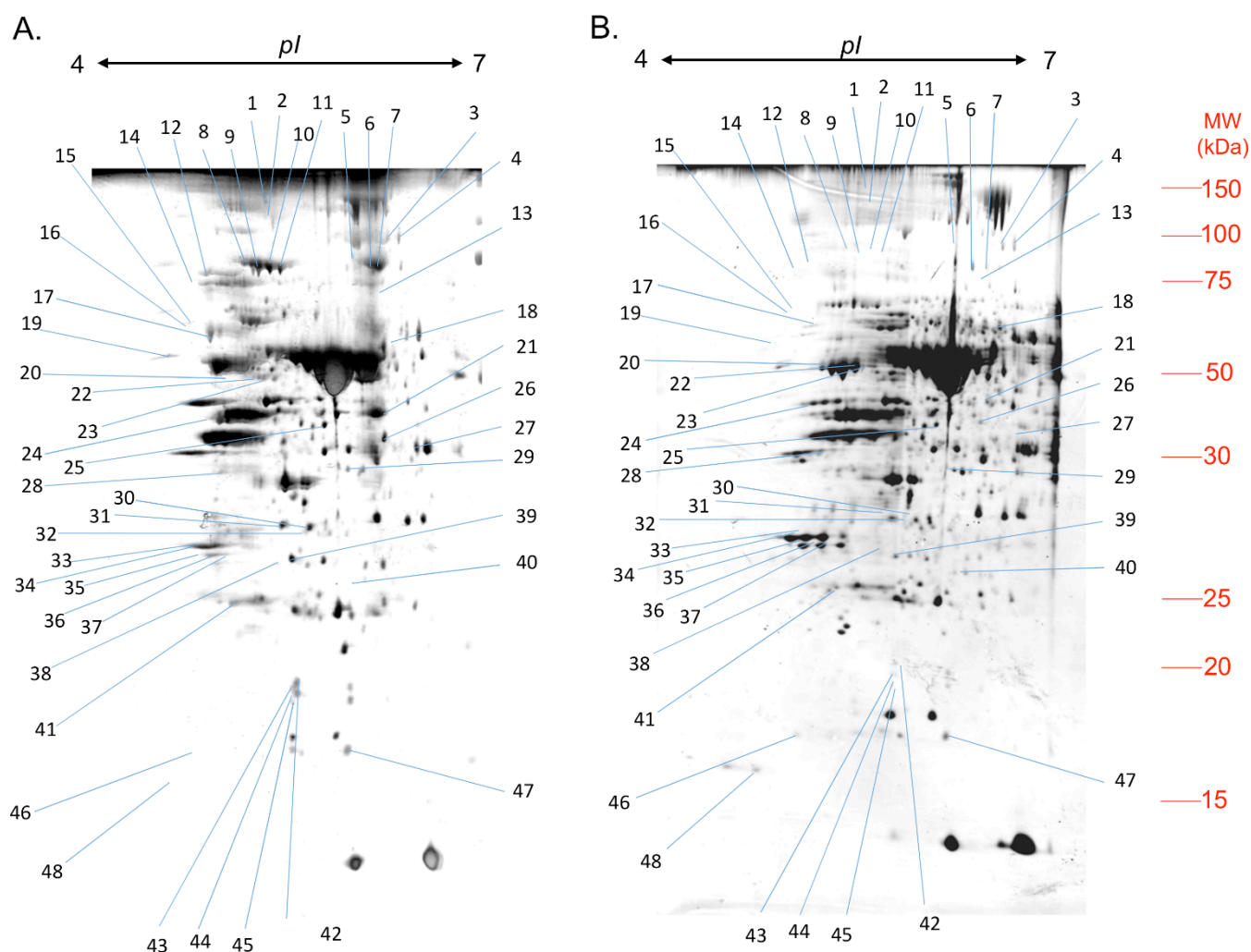
The relative expression of genes involved in Cu transport (*HMA1*, *COPT2*) is given in Figure III.2. Expression of the *HMA1* gene encoding a chloroplastic Cu transporter was monitored in leaves, whereas *COPT2*, which encodes a transporter involved in Cu uptake, was monitored in roots. The relative number of *HMA1* transcripts increased 2.68 fold (2.23-3.24) after 25d of Cu depletion (Figure III.2.A). Transcripts of *COPT2* were detected only in roots from Cu-depleted plants suggesting that the expression of the *COPT2* transporter was up-regulated and/or de-repressed in *Brassica napus* roots in response to Cu deficiency (Figure III.2.B).

### 3.3 Cu depletion affects uptake of some mineral nutrients

Figure III.3 shows that Cu deprivation decreased Cu uptake by 81.8 %, but also affected the uptake of Na (-41.0%), B (-31.6%) and Mg (-28.5%). However, keeping in mind that plant dry weight was reduced by 18.4 % (Table III.2), only the decreases in Cu and Na uptake should be considered as highly significant. Cu deficiency had no effect on total plant uptake for nutrients such as N, Ca, K, S, P, B, Fe, Mn and Zn, despite the difference of biomass. In contrast, uptake of Mo was increased by 121.8% despite the reduced plant growth and was associated with a very strong up-regulation of the molybdenum transporter 1 gene (*MOT1*, Figure III.2.C), having an important role in efficient Mo uptake (Tomatsu *et al.*, 2007). Indeed, in Cu-depleted plants, the number of *MOT1* transcripts was found to be 159.61 fold (127-200) higher than in control plants.

### 3.4 Cu depletion induces proteomic modifications

Leaves already present at the beginning of Cu depletion were the most affected tissues, not only due to their decreased Cu content and hence the mobilization of Cu (by about 60%) to other tissues, but also according to the Mg, Na, Ca and Fe contents (data not shown). Therefore, leaves were selected for a comparative proteomic approach in order to highlight the main metabolic modifications induced by Cu depletion. Representative 2D gels corresponding to protein extracts from leaves of control and Cu-depleted plants are shown in Figure III.3. On each gel, 693 proteins were identified. Their comparative analysis revealed 48 proteins significantly up- or down-regulated by Cu depletion. Because different spots correspond to different isoforms of the same protein, only 33 different proteins



**Figure III.4: Representative Silver-stained 2-DE gels of proteins** from old leaves of *Brassica napus* L. after 25 days of culture with (control, A) or without Cu (-Cu, B). A total of 150  $\mu$ g of total proteins was loaded on an IEF strip forming an immobilized pH linear gradient from 4 to 7 (for details, see “Materials and Methods”). Numbers indicate sequenced and identified proteins presented in table 3. Molecular mass markers (MW in kDa) are listed on the right side of the gel.

were identified. Among them, 25 proteins were accumulated in Cu-depleted old leaves. Transketolase-like protein (#7 to 11, Figure III.3 and Table III.3) was the strongest protein induced with four isoforms that were accumulated more than four fold compared to control. On the other hand, repression was significant in only 8 of the 33 identified proteins, with the Oxygen Evolving Enhancer (OEE, #33 to 37) having the greatest repression in our study (-2.3 to -3.93). Among all proteins (Table III.3), five were involved in stress responses (disease/defence or defence/secondary metabolite), for example glutathione reductase (#18), and seventeen proteins were involved in energy processes, for example aldolase (#27) and ATP synthase (#17). Protein annotations in databases also indicated that chloroplasts were the main locations of the identified proteins with 17 references, including the most repressed, OEE (#33 to 37), and the most induced, Transketolase-like protein (#7 to 11).

Under our conditions, and Considering some of the characteristic Cu proteins reported in the literature (Ravet *et al.*, 2011), Plastocyanin was too small (around 10 kDa) to be found on our gels while Cu-Zn superoxide dismutase and Polyphenol oxidase were not differentially expressed and/or detected.

## 4. Discussion

### 4.1 Cu remobilization from old leaves is induced by Cu deficiency

In this study, the effectiveness of Cu deficiency can be attested by the low Cu concentration found in old and young leaves of Cu depleted plants ( $0.97 \pm 0.03 \mu\text{g.g}^{-1}$  DW and  $1.66 \pm 0.40 \mu\text{g.g}^{-1}$  DW, respectively) which was lower than the usually admitted minimum concentration ( $5 \mu\text{g.g}^{-1}$  DW) (Marschner, 2012). Using Cu deficiency we were able to demonstrate a decrease in the Cu content of leaves by  $61.4 \pm 4.2\%$  (Table III.2). To our knowledge, alongside work on *Arabidopsis thaliana* (del Pozo *et al.*, 2010), this is one of the few studies that shows that Cu can be recycled between leaves. However, the Cu remobilization could be underestimated in our conditions because some traces of Cu were found in the nutrient solution, as suggested by the slight increase in the overall Cu content in Cu-depleted plants (Table III.2). A precise estimation of Cu remobilization would require the use of stable isotopes. This remobilization of Cu in leaves was concomitant with an increase in *COPT2* and *HMA1* expression. Because the RuBisCO, N amounts and chlorophyll contents were not differentially affected

**Table III.3: Abundance of identified proteins over (positive value) or under (negative value) accumulated in old leaves of Cu-depleted *B. napus* relative to control plants.** Experimental and theoretical pI / Mw, the number of LC-MS/MS matched peptides (PM), the SCORE and the percentage of sequence coverage (SC) obtained are also indicated. For each protein, the assigned best-matched protein is listed with the organism in which it was identified and its GenBank protein accession number is indicated. Elements given in notes correspond to ligand (in italics) or regulators (in bold) of the corresponding protein described in previous studies (indicated in brackets).

Spot no.	Relative Abundance	Exp. pI / Mw	Theo. pI / Mw	PM	SC (%)	Protein name / Organism / NCBI accession no.	Functional classification / Sub-Cellular localization	Note
1	3.12	5.7 / 115	5.39 / 104.3	30	20	Myrosinase binding protein [ <i>Brassica napus</i> ]/gi 1711296	11. Disease/Defence	
2	2.11	6.3 / 99	6.59 / 102.2	11.7	40	Chaperone protein ClpC, chloroplast-like [ <i>Fraxaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> ]/gi 470122943	08. Intracellular traffic / Chloroplast	
3	1.75	6.64 / 90	6.12 / 84.3	58	24	Cobalamin-independent methionine synthase [ <i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i> ]/gi 297807807	01. Metabolism	<b>Zn</b> [73]
4	2.78	6.53 / 91	6.12 / 84.3	29	19	Cobalamin-independent methionine synthase [ <i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i> ]/gi 297807807	01. Metabolism	<b>Zn</b> [73]
5	4.16	6.26 / 80	6.16 / 81.2	13	13	NADH Ubiquinone oxidoreductase 75 kD subunit [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 30693102	02. Energy / Chloroplast-Mitochondria	[Fe-S] cluster
6	5.23	6.5 / 81	5.80 / 81.5	15	18	Transketolase-like protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 7329685	02. Energy / Chloroplast-Mitochondria	
7	2.22	6.41 / 80	6.12 / 79.9	13	10	Transketolase [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 30689983	02. Energy / Chloroplast-Mitochondria	
8	4.79	5.74 / 75	6.16 / 81.2	46	24	Transketolase-like protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 7329685	02. Energy / Chloroplast-Mitochondria	
9	4.17	5.78 / 75	6.16 / 81.2	61	27	Transketolase-like protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 7329685	02. Energy / Chloroplast-Mitochondria	
10	4.46	5.67 / 76	6.16 / 81.2	62	29	Transketolase-like protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 7329685	02. Energy / Chloroplast-Mitochondria	
11	4.23	5.54 / 74	6.16 / 81.2	44	26	Transketolase-like protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 7329685	02. Energy / Chloroplast-Mitochondria	
12	2.06	5.25 / 73	5.08 / 70.7	49	37	Heat shock cognate protein HSC70 [ <i>Brassica napus</i> ]/gi 2655420	08. intracellular traffic / Chloroplast	<b>Zn</b> [16]
13	-2.07	6.48 / 70	5.56 / 63.4	10	11	Phosphoglucosmutase [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 5223226	02. Energy / Chloroplast	
14	-2.03	5.17 / 69	5.62 / 72.0	25	16	ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH 2, chloroplast-like [ <i>Brachypodium distachyon</i> ]/gi 357123383	06. Prot. Dest. & Storage / Chloroplast	<b>Zn</b> [74]
15	1.54	6.14 / 64	5.22 / 49.4	11	7	Thylakoid rhodanese-like protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 18411523	02. Energy / Chloroplast	<b>Cu</b> and <b>Zn</b> [75]
16	1.4	6.08 / 62	5.66 / 47.6	5	4	Thylakoid rhodanese-like protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 18411523	02. Energy / Chloroplast	<b>Cu</b> and <b>Zn</b> [75]
17	2.63	5.25 / 62	5.97 / 47.0	85	42	ATPase subunit I [ <i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i> ]/gi 297837977	02. Energy / Chloroplast-Mitochondria	<b>Cu</b> and <b>Zn</b> [16]
18	-2.67	6.52 / 61	8.03 / 60.6	15	19	Glutathione reductase [ <i>Brassica juncea</i> ]/gi 3448672	20. Defence & Secondary metabolism / Vacuole	<b>Cu</b> [16]
19	2.09	4.92 / 55	5.23 / 50.6	7	5	Rhodanese-like domain-containing protein 4, chloroplast-like [ <i>Cicer arietinum</i> ]/gi 502179307	01. Metabolism / Chloroplast	<b>Cu</b> [75]
20	-2.27	5.45 / 50	6.49 / 51.0	19	16	NAD(P)H dehydrogenase subunit 48 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 18394307	02. Energy / Chloroplast	
21	1.52	6.44 / 47	5.91 / 50.1	25	21	Phosphoglycerate kinase I [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 5240595	02. Energy / Chloroplast-Mitochondria	<b>Cu</b> [17]
22	1.92	5.58 / 53	6.06 / 54.2	19	19	Mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 21594004	06. Prot. Dest. & Storage / Mitochondria	
23	2.81	5.53 / 52	6.06 / 54.2	7	11	Mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 21594004	06. Prot. Dest. & Storage / Mitochondria	
24	2.97	5.11 / 46	6.78 / 47.9	61	46	Chloroplast ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase [ <i>Brassica oleracea</i> ]/gi 383470439	02. Energy / Chloroplast	
25	1.7	6.03 / 44	6.43 / 50.2	44	32	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase 2 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 15229018	01. Metabolism	B6 dependent [56]
26	1.42	6.44 / 42	5.91 / 15.1	16	45	Cinnamyl alcohol dehydrogenase [ <i>Brassica napus</i> ]/gi 6683959	01. Metabolism	
27	1.46	6.64 / 40	6.22 / 38.4	19	37	Fructose-bisphosphate aldolase [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 15231715	02. Energy / Chloroplast-Mitochondria	<b>Cu</b> [16] and <b>Zn</b> [76]
28	1.47	5.24 / 37	5.14 / 32.0	9	35	40S ribosomal protein [ <i>Brassica napus</i> ]/gi 15214300	05. Protein synthesis / Ribosome	
29	1.33	6.16 / 37	8.54 / 35.8	29	31	Mitochondrial NAD-dependent malate dehydrogenase [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 21592905	02. Energy / Mitochondria	<b>Cu</b> [16] and <b>Zn</b> [77]
30	1.72	5.7 / 32	8.32 / 40.3	49	34	Ferredoxin-NADP(+)-oxidoreductase I [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 5239282	02. Energy / Chloroplast	[Fe-S] cluster
31	1.56	5.8 / 32	8.66 / 40.1	34	29	Ferredoxin-NADP+ reductase [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 5730139	02. Energy / Chloroplast	[Fe-S] cluster
32	2.1	5.84 / 32	6.12 / 33.0	13	25	Pyridoxine biosynthesis protein [ <i>Lotus japonicus</i> ]/gi 7256517	11. Disease/Defence / Cytoplasm	B6 biosynthesis [55]
33	-3.93	4.88 / 31	5.92 / 35.0	5	15	Oxygen-evolving enhancer protein 1-2 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 5230324	02. Energy / Chloroplast	<b>Mn</b> [78]
34	-2.3	4.92 / 30	5.92 / 35.0	81	54	Oxygen-evolving enhancer protein 1-2 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 5230324	02. Energy / Chloroplast	<b>Mn</b> [78]
35	-2.56	4.94 / 30	5.93 / 35.1	36	48	Photosystem II subunit O-2 [ <i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i> ]/gi 297819782	02. Energy / Chloroplast	<b>Mn</b> [78]
36	-2.95	5.03 / 30	5.93 / 35.1	67	52	Photosystem II subunit O-2 [ <i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i> ]/gi 297819782	02. Energy / Chloroplast	<b>Mn</b> [78]
37	-2.8	5.32 / 30	5.92 / 35.0	84	55	Oxygen-evolving enhancer protein 1-2 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 5230324	02. Energy / Chloroplast	<b>Mn</b> [78]
38	1.69	5.61 / 29	8.65 / 33.7	13	11	Thioredoxin-like protein CDSF32 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 5222954	11. Disease/Defence / Cytoplasm	
39	3.81	5.73 / 29	6.54 / 29.5	23	17	Carbonic anhydrase I [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 30678347	01. Metabolism / Chloroplast	<b>Cu</b> and <b>Zn</b> [79]
40	-1.81	6.17 / 27	6.28 / 27.6	29	34	Mitochondrial F1F0-ATP synthase subunit F6d [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 5226479	02. Energy / Mitochondria	<b>Cu</b> [18] and <b>Zn</b> [16]
41	1.55	5.28 / 26	7.67 / 33.3	10	16	Triosephosphate isomerase [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 15226479	02. Energy / Chloroplast-Mitochondria	
42	2.41	5.73 / 20	5.37 / 19.9	9	26	Uncharacterized protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 18391006	13. Unclassified	
43	2.79	5.7 / 19	5.47 / 35.7	41	38	Chloroplast beta-carbonic anhydrase [ <i>Brassica napus</i> ]/gi 297787439	01. Metabolism / Chloroplast	<b>Cu</b> and <b>Zn</b> [79]
44	2.6	5.75 / 19	6.81 / 21.8	6	17	Germin-like protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 1755154	12. Unclear Classification	
45	1.99	5.7 / 19	6.27 / 22.0	7	23	ReeName: Full=Germin-like protein 1; Flags: Precursor [ <i>Sinapis alba</i> ]/gi 169944	12. Unclear Classification	
46	-2.6	4.99 / 17	9.12 / 24.7	18	31	Peroxiredoxin-2E [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 15231718	11. Disease/Defence / Cytoplasm	
47	2.74	6.11 / 17	8.80 / 24.3	22	22	Rieske FeS protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 9843639	02. Energy / Chloroplast	[Fe-S] cluster
48	-1.76	4.58 / 16	5.24 / 17.9	6	15	Probable glycine cleavage system H protein 2 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]/gi 5223217	02. Energy / Chloroplast	

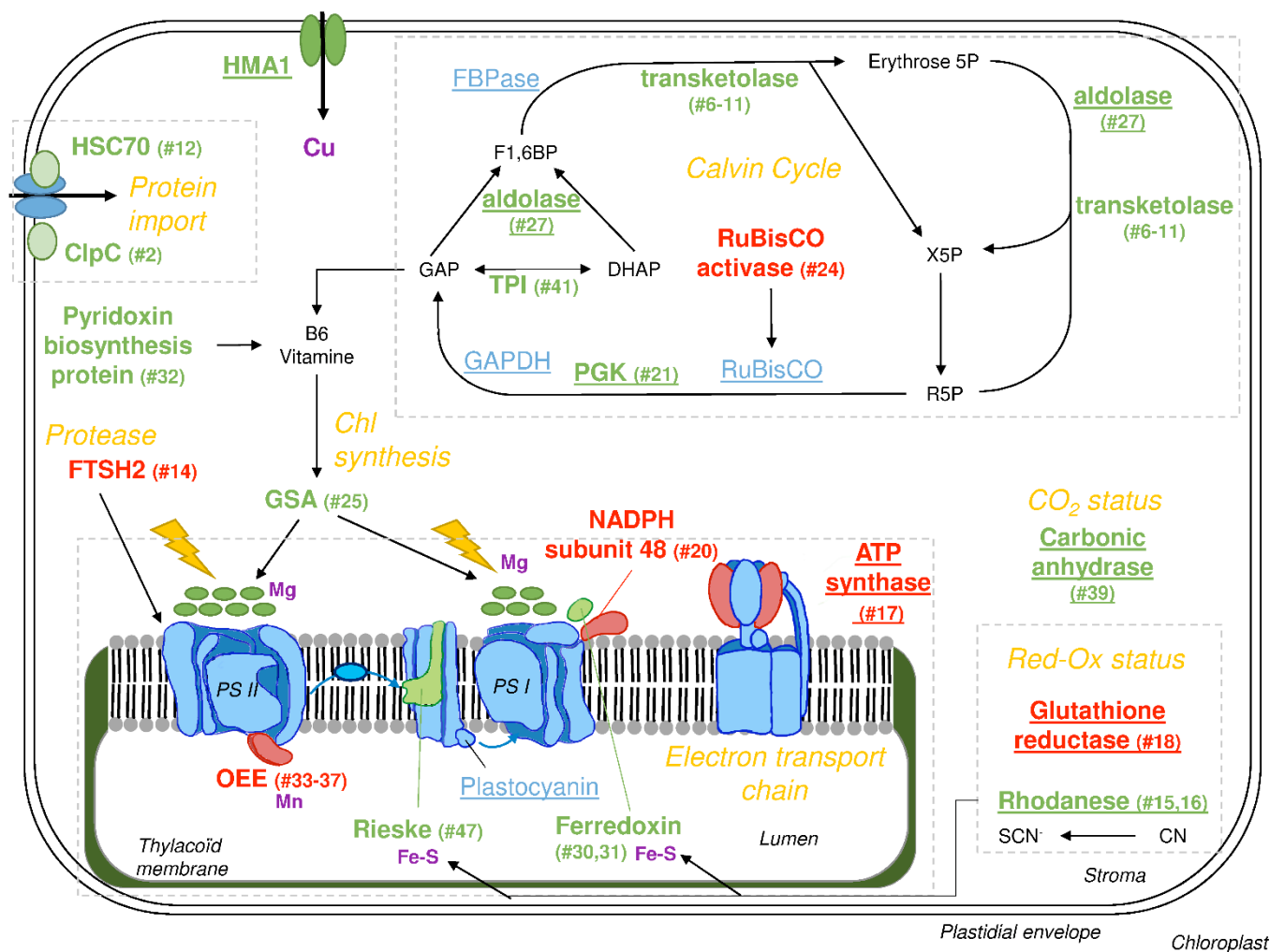


between control and Cu-depleted plants (Figure III.1), we could assume that Cu remobilization was not associated with leaf senescence. This is also consistent with the down-regulation of senescence-associated proteases such as FtsH2 (#14, Table III.3), a protease involved in the degradation of photosystem II (Avice and Etienne, 2014 ; Burda *et al.*, 2003). Thus, this study suggests that Cu depletion induces a Cu mobilization independent of the distinguishing marks of senescence. This is different to the findings for N, for example, for which N deficiency is known to increase leaf senescence in *Brassica napus* (Desclos *et al.*, 2008).

#### 4.2 Effect of Cu deficiency on metabolic pathway in chloroplasts from old leaves of *B. napus*.

Because the spots of our 2D-E gels correspond to the most abundant proteins in old leaves, numerous proteins (especially transporters and transcription factors) corresponding to transcripts identified in previous studies as regulated by Cu depletion could not be observed in the present work. Thus, this study complement previous transcriptomic data on Cu remobilisation (Andrés-Colás *et al.*, 2013 ; Bernal *et al.*, 2012). This proteomic analysis of Cu-deficient old leaves showed that more than half of the up or down-regulated proteins were localised in chloroplasts (Table III.3) indicating potential disturbance, despite an absence of chlorophyll content variation (Figure III.1.B, C). Five of these proteins are involved in the Calvin cycle and 5 are involved in the thylakoid electron transport chain (Figure III.5). From a general point of view, among the 33 proteins that were differentially expressed relatively to control plants (Table III.3) 11 of them are known to rely on the presence of Cu for their synthesis and/or activity, and 9 were over expressed (#15, 16, 17, 19, 27, 29, 39 and 43). As a consequence, it could be suggested that the lack of Cu reduced their activity which may explain their up-regulation (or alternatively reduced their down-regulation). A similar regulation would also occur for enzymes that are located upstream or downstream of such copper deficiency up-regulated proteins. For example, this is the case (Figure III.5) within the Calvin cycle for Transketolases (#6-11) or TPI (#41), which are located upstream and downstream of Aldolase (#27), a copper dependent protein that was up-regulated by Cu-deficiency

Among Cu binding or regulated enzymes within the Calvin cycle (FBPase (Slovacek and Monahan, 1983), GAPDH, Aldolase (Tan *et al.*, 2010), RuBisCO



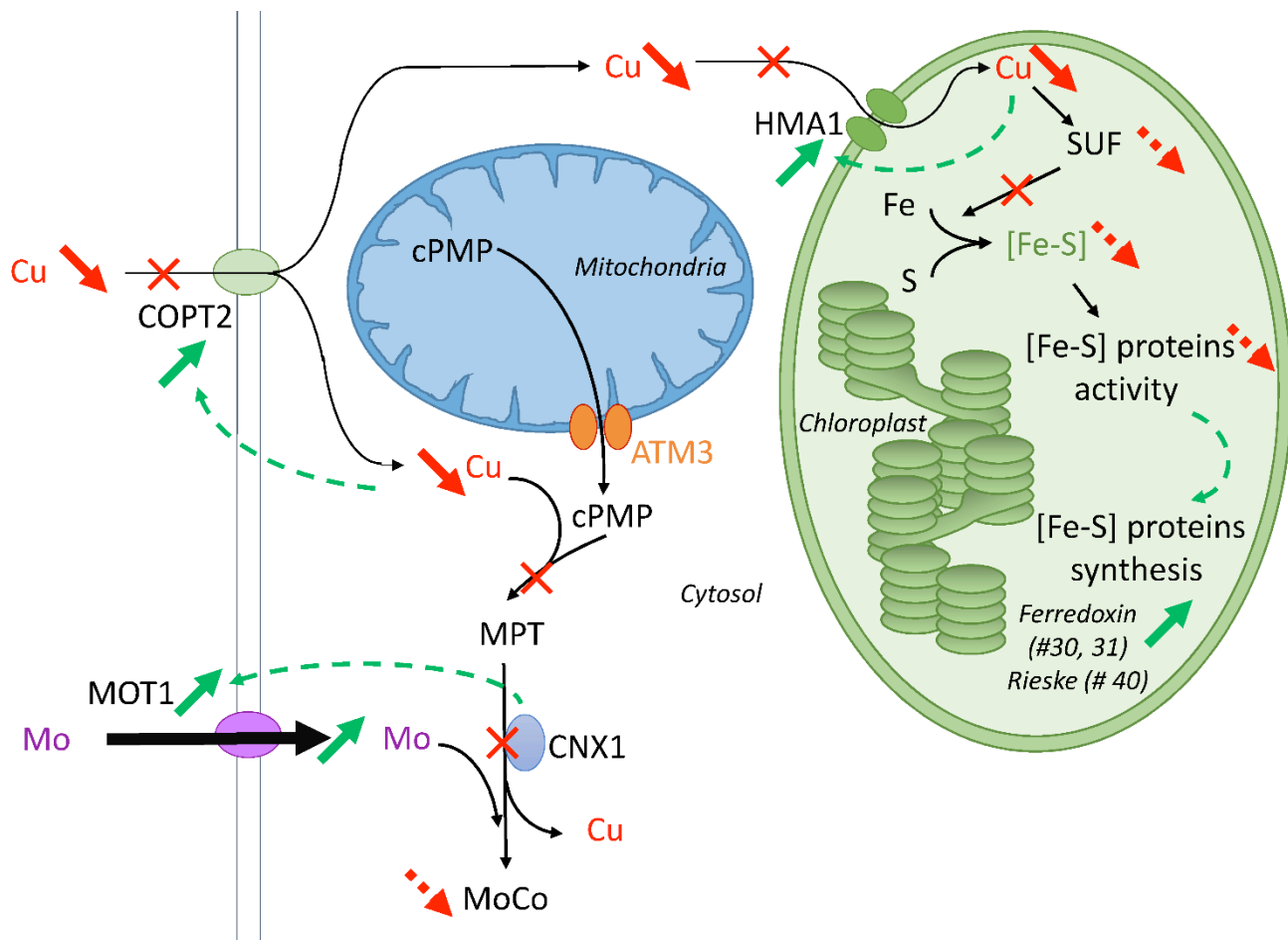
**Figure III.5: Effect of Cu deficiency on metabolic pathways in chloroplasts from old leaves of *B. napus*.** Bold red indicates a decrease in the amount of protein while bold green indicates an increase. Spot number(s) corresponding to proteins identified in table 3 are indicated in parentheses. Intermediate metabolites are in black, proteins not identified in 2D-E analysis are in blue. Pathways are encircled by grey dashed lines and named in orange italics. Underlines indicate Cu binding and/or known Cu regulation. Other elements known to bind and/or regulate proteins are indicated in purple. PS I: Photosystem I; PS II Photosystem II; R5P: ribulose-5-phosphate; X5P: xylose-5-phosphate; F1,6BP: Fructose-1,6-bisphosphate; GAPDH: GlycerAldehyde Phosphate DeHydrogenase; PGK: PhosphoGlucoKinase; GAP: GlycerAldehyde-3-Phosphate; FBPase: Fructose-1,6-BisPhosphatase; TPI: Triose Phosphate Isomerase; GSA: *Glutamate-1-Semialdehyde 2,1-Aminomutase*; OEE: Oxygen Evolving Enhancer; Chl: Chlorophyll; CN: cyanate; SCN: Thiocyanate.

(Kung *et al.*, 2006), PGK (Bailey *et al.*, 1968)), only Aldolase (#27) and PGK (#21) were found to be over represented (Table III.3 and Figure III.5). Although RuBisCO was not significantly affected (Figure III.1), its main regulator RuBisCO activase (#24) was increased by about 3 folds. (Table III.3). It should be noted that PGK, Aldolase, Transketolase and TPI are also involved in glycolysis (in the cytosol or plastids (Munoz-Bertomeu *et al.*, 2009)) and their regulation should therefore induce mitochondrial defects.

GAP is a crosspoint between numerous pathways, with B6 vitamin biosynthesis being one of them (Mooney and Hellmann, 2010). However, under an impaired Calvin cycle, more GAP would be available for this cycle (Figure III.5). Vitamin B6 can also be synthesized through Pyridoxin biosynthesis protein (#32, Table III.3) which is over represented in old leaves of Cu-depleted *B. napus*. The B6 dependent protein Glutamate-1-semialdehyde aminomutase (GSA, #25) (Hennig *et al.*, 1997) was also accumulated and had a role in chlorophyll biosynthesis (Figure III.5).

Differentially expressed proteins located in thylakoids (Figure III.5) could be subdivided into two groups: the first one including OEE (#33 to 37), NADPH subunit 48 (#20) and ATP synthase (#17) were down-regulated, which is consistent with previous work reporting a down-regulation of photosynthesis-related genes in response to Cu deficiency (Bernal *et al.*, 2012). The second group corresponded to [Fe-S] cluster containing proteins such as Ferredoxin (#30 and 31) and Rieske domain protein (#47), which were over expressed in response to Cu depletion. We suggest that overall the electron transport chain was down-regulated, but an impairment of [Fe-S] cluster biosynthesis could be compensated by an up-regulation of *de novo* synthesis of [Fe-S] proteins. This stimulation of [Fe-S] cluster proteins can be linked to the accumulation of Rhodanese family members (#15 to 16), previously described as protecting [Fe-S] clusters (Cereda *et al.*, 2009) in addition to their role in cyanate detoxification.

Previous studies (Andrés-Colás *et al.*, 2013 ; Yamasaki *et al.*, 2009) highlighted the transcription factor SPL7 (SQUAMOSA-promoter binding link protein 7) which seems to coordinate the early response to Cu deficiency by targeting a Cu response element (CuRE) in the promoter of genes differentially expressed during Cu deficiency. Unfortunately, we couldn't performed an analysis



**Figure III.6: Crosstalk between Cu, [Fe-S] and Mo.** Bold arrows indicate variation (green: increase; red: decrease). Full arrows represent observations from this study while dashed arrows have been deduced from the literature. The synthesis of chloroplatic [Fe-S] clusters is controlled by SUF (Sulphur Assimilation Protein), itself controlled by the level of Cu. On the other hand, in the mitochondria, the MoCo precursor cPMP, is exported through mitochondrial membrane by support of the ATM3 transporters. In the cytosol, the second and third steps of MoCo biosynthesis are highly dependent on Cu levels. MoCo is then incorporated into Mo proteins such as Nitrate reductase and into Mo-[Fe-S] proteins such as Xanthine dehydrogenase. The up-regulation of Copt2, HMA1 and Mot1 could be explained by feedback signals due to a low [Cu] in cell, in cytosol and an impairment of CNX1 activity respectively. cPMP: cyclic Pyranopterin MonoPhosphate; MPT: MolybdoPTerin; ATM: ATP-binding cassette Transporters of Mitochondria.

on promoters of genes corresponding to the proteins presented in Table III.3 as *B. napus* genome sequence is not yet available. However, regulation seems to be complex as Cu deficiency induces a down-regulation at transcript level of carbonic anhydrase (Andrés-Colás *et al.*, 2013), but it was up-regulated at protein level in our study (#39). It should be noted that the Carbonic anhydrase regulation is independent from SPL7 (Andrés-Colás *et al.*, 2013) and thus its regulation should not be directly induced by Cu deficiency. Moreover, previous studies on Cu deficiency also reported a variation of microRNAs (Andrés-Colás *et al.*, 2013 ; Bernal *et al.*, 2012) or proteases ((Castruita *et al.*, 2011) as well as FTSH2 #14, Table III.3 and Figure III.5) that could impact on the translation and the proteolysis and thus lead to differences between transcriptomic and proteomic results.

#### 4.3 Crosstalk between Cu, [Fe-S] and Mo

Surprisingly, among all quantified mineral nutrients, only Mo uptake was strongly increased in Cu-depleted plants (Figure III.1) and this was further linked to strong up-regulation of *MOT1* gene in roots (Figure III.2). The relation between Mo and Cu homeostasis has been reported several times but remains poorly explained (Basak *et al.*, 1982 ; Lidon and Henriques, 1993 ; O'Sullivan and Ernest, 2007 ; Wallace *et al.*, 1977). As an example, in lesser yam (*Dioscorea esculenta*) (O'Sullivan and Ernest, 2007), molybdenum reached a higher concentration in Cu depleted plants than in plants submitted to any other nutrient deficiencies.

The crosstalk between Cu, Mo and [Fe-S] established from the literature and the present study are summarised in Figure III.6 and can explain the up-regulation of Mo uptake (Figure III.1) and expression of [Fe-S] proteins (Rieske #47 and Ferredoxin #30, 31, Table III.3) by Cu deficiency. Indeed, the chloroplast produces its own [Fe-S] clusters through the sulfur assimilation proteins SUF machinery (Pilon *et al.*, 2006), which is alike the bacteria system. An interaction with Cu probably occurs in the first step of [Fe-S] clusters biosynthesis, as SUF were found to be inhibited by a Cu deficiency in *Bacillus subtilis* (Chillappagari *et al.*, 2010). As previously discussed, our leaf proteomic analysis revealed two identified proteins that were over-expressed during Cu deficiency, Ferredoxin and Rieske protein which contain [Fe-S] clusters (#30, 31, 47, Table III.3, Figure III.6). We may hypothesized that their activity was lowered due to [Fe-S] cluster destabilization by



Cu-depletion. This should lead to the observed up-regulation of both proteins to compensate for a possible loss of activity.

At cellular level, Mo is essentially used by the Molybdenum Cofactor (MoCo) which is essential for key enzymes such as nitrate reductase and aldehyde oxidase (Hänsch and Mendel, 2009). The first step of the MoCo biosynthesis occurs in the mitochondria and produces cPMP (Figure III.6, Mendel, (2013)). cPMP is then exported across the mitochondria membrane by support of the ATM3 transporter (Teschner *et al.*, 2010). In the cytosol, it must bind Cu in order to be metabolised into MPT representing a step that should be affected in Cu depleted plants. Then, the CNX1 multidomain protein releases Cu and inserts Mo from MPT to give a functional MoCo molecule (Kuper *et al.*, 2004). It has been reported that CNX1 binds to the cytoskeleton (Schwarz *et al.*, 2000) and could have a role as a Mo sensor, interacting with MOT1 transporter to regulates Mo concentration in the cell (Tejada-Jiménez *et al.*, 2009). Overall, it would explain how the Cu deficiency indirectly up-regulates the Mo uptake through the increase of MOT1 expression.





## CHAPITRE 4 : La remobilisation du Mg induite par une privation en Mg est indépendante de la sénescence chez *Brassica napus*

---

### Avant-propos

Chez le colza, nous avons évalué la **remobilisation nette foliaire du Mg**, dans le cadre d'une carence appliquée pendant 25 jours. Afin **d'identifier d'éventuelles interactions avec d'autres éléments minéraux**, des analyses ionomiques ont été réalisées à partir de plantes carencées ou non en Mg. Nous avons également **identifié les protéines des feuilles dont quantité est affectée positivement ou négativement par une carence en Mg**, tout suivant l'expression de transporteurs potentiellement impliqués dans l'absorption ou le transport de cet élément. Afin **de déterminer si la remobilisation foliaire éventuelle du Mg était ou non associée aux mécanismes mis en place au cours de la sénescence foliaire**, nous avons également quantifié quelques marqueurs ce processus, tels que le contenu en RuBisCO, en N, en chlorophylles et en protéases, dont la variation (ou l'absence de variation) nous permettent d'évaluer les liens entre la remobilisation du Mg et la sénescence.

#### Résultats majeurs :

- **Le Mg est remobilisé à 55,3% dans les feuilles présentes avant le début de la carence,**
- **L'absorption du Zn et du Mn augmente d'environ 50% chez les plantes carencées en Mg,**
- **La remobilisation du Mg en situation de carence est indépendante de la sénescence, suivant les marqueurs étudiés.**

Les résultats de ces travaux ont été regroupés dans l'article intitulé « Leaf magnesium remobilization induced by Mg deficiency is a senescence-independent process in *Brassica napus* L. », qui a été soumis à « Journal of Experimental Botany » (En cours d'évaluation).



**Leaf magnesium remobilization induced by Mg deficiency is a senescence-independent process in *Brassica napus* L.**

Vincent Billard<sup>1,2,3</sup>, Philippe Etienne<sup>1,2,3</sup>, Anne Maillard<sup>1,2,3</sup>, Maria Garnica<sup>4</sup>, Laurent Coquet<sup>5</sup>, Thierry Jouenne<sup>5</sup>, Florence Cruz<sup>6</sup>, José-Maria Garcia-Mina<sup>4</sup>, Jean-Claude Yvin<sup>6</sup>, Alain Ourry<sup>1,2,3,7</sup>

1. Normandie Université, Caen, France
2. UNICAEN, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, Esplanade de la Paix, CS14032, 14032 Caen Cedex 5, France
3. INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, Esplanade de la Paix, CS14032, 14032 Caen Cedex 5, France
4. Timac Agro Spain, Poligono de Arazuri-Orcoyen Calle C n°32, 31160 Orcoyen, Spain
5. Plateforme de protéomique PISSARO, UMR6270 CNRS Faculté des Sciences de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France
6. Centre de Recherche International en Agroscience, CRIAS-TAI, Groupe Roullier, 55 boulevard Jules Verger, 35800 Dinard, France
7. Corresponding author: alain.ourry@unicaen.fr, phone: +33 231 565 653, fax: +33 231 565 360.

**Keywords**

Manganese, proteomic analysis, zinc.



## Abstract

In order to cope with a variable supply of mineral nutrients, higher plants have developed numerous strategies including oriented and increased root growth, increased transporter activities and, potentially, the remobilization of nutrients from source to sink tissues. However, such processes remain relatively unknown for magnesium, which is the third most important cation found in plant tissues. The aims of this work were to quantify Mg remobilization and identification of the main mechanism involved when *Brassica napus* L. plants faced Mg deprivation. While growth of roots and young shoot tissues was strongly reduced, Mg depletion did not affect old leaf growth despite remobilization of Mg from old leaves to young shoot tissues whose total Mg content reduced by 55.3. In the meantime, no evidence was found of an increased expression of root Mg transporters triggered by deprivation. Proteomic analysis of old leaves showed amongst other results that some proteins that require Mg for their functionality (isocitrate dehydrogenase for example) were up-regulated and this was probably due to their lower activity resulting from Mg<sup>2+</sup> replacement by Mn<sup>2+</sup>, which is also supported by an increase in relative Mn<sup>2+</sup> uptake. In the meantime, the expression of some proteases (FTSH,  $\beta$ 1-subunit of proteasome) was lowered by Mg deprivation without a change in leaf chlorophyll content or any decrease in N content in old leaves. Moreover, the accumulation of all identified proteins involved in chloroplastic electron chain transport was up-regulated. Overall, the data showed that mobilization of Mg in old leaves was induced by deprivation, probably mostly at the expense of previously stored free Mg<sup>2+</sup>, which may explain why leaf senescence was not increased, as revealed by the responses of different senescence markers.

## Abbreviations

DW: Dry Weight, IRMS: Isotope-Ratio Mass Spectrometry, ICP-OES: Inductively couple plasma optical emission spectrometry, RT: Reverse transcription, Q-PCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction, RuBisCO: Ribulose-1,5-BISphosphate Carboxylase/Oxygenase, GAPDH: GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase, OEE: Oxygen Evolving Enhancer, PGK: PhosphoGlucokinase, PSI: PhotoSystem I, PGM: PhosphoGlucMutase ; HSC70: Heat Shock Cognate 70kDa, Zn-Cu SOD: Zn-Cu SuperOxide Dismutase ; 3PGDH 3-PhosphoGlycerate DeHydrogenase ; PK: Pyruvate Kinase ; PFK: PhosphoFructoKinase



## 1. Introduction

Magnesium is a key element for plant metabolism. Being one of the most abundant cations in plants after  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  impacts ion balance, especially in thylakoids (Shaul, 2002). Furthermore, in the chloroplast it has a central position in the porphyrin ring of chlorophyll, which makes it essential for photosynthesis. Mg is also crucial for many enzymes (“ExPASy: SIB Bioinformatics Resource Portal - Home,”) involved in fundamental metabolisms such as RNA and protein synthesis (Pasternak *et al.*, 2010). Indeed, some Mg-dependent enzymes require binding to one or two Mg atoms to be active. As an example, Enolase, a metalloenzyme involved in phosphoenolpyruvate synthesis during glycolysis needs to bind to two  $\text{Mg}^{2+}$  to be fully active (Reed *et al.*, 1996). Moreover,  $\text{Mg}^{2+}$  can also interact directly with the substrate rather than the enzyme. The best example of the former is ATP, which forms an ATP- $\text{Mg}^{2+}$  complex in Kinase or ATPase reactions (Cowan, 2002). Thus, Mg deficiency in higher plants impaired not only ATP synthesis but also various ATP-dependent reactions such as macromolecule transport. As an example, in bean, previous work has shown that Mg depletion strongly decreases the phloem loading of sucrose, an active and carrier-mediated process using a proton pumping ATPase on the plasma membrane of the sieve tube cells. (Cakmak *et al.*, 1994b).

However, despite all its crucial roles in plant metabolism, Mg is considered much less frequently in agriculture and laboratory studies compared to the other macronutrients, N, P, K and S. Thus, Mg has been often referred to as the forgotten macro element (Cakmak and Yazici, 2010). Indeed, the first physiological characterization of Mg deficiency associated with high light exposure in *Arabidopsis thaliana* is less than ten years old (Hermans and Verbruggen, 2005). The deciphering of Mg transport in plants was also revived quite recently with the description of its transporters. In *Arabidopsis*, genes encoding  $\text{Mg}^{2+}$  transporters were described using two different nomenclatures: “AtMRS2” (*Arabidopsis thaliana* Mitochondrial RNA Splicing 2) and “MGT” (Mg Transporters). The “AtMRS2” gene family was based on homology with the MRS2 gene previously identified in yeast. The first description counted 10 putative members (Schock *et al.*, 2000) but an eleventh was added more recently (Drummond *et al.*, 2006). At almost the same time, MGT transporters were described (Li *et al.*, 2001). Interestingly, MRS2-9 does not have an equivalent in MGT nomenclature. However, for simplification only the MGT nomenclature will be used. (See (Waters and Sankaran,





2011) for the correspondence between both nomenclatures). Except for MGT8, all the MGT genes have a homologous gene in rice (Gebert *et al.*, 2009). The definitive function of the MGT family members remains to be established because all mutant phenotypes are not yet available, with the exception of MGT5 and MGT9 mutants which show pollen development defects (Chen *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2008) and a MGT7 mutant showing growth defects on low Mg medium (Gebert *et al.*, 2009). The absence of mutant phenotypes is probably due to their high redundancy in the same tissue. For example, MGT1, MGT2, MGT3, MGT4, MGT7 and MGT9 are all located in the root, and particularly in vascular tissues apart from MGT1 which is a high affinity transporter strongly expressed throughout the root from early stages of development (Gebert *et al.*, 2009). However, molecular mechanisms involved in Mg uptake still remain unclear.

As sessile organisms, higher plants have to cope with permanently fluctuating mineral resource availability. Besides strategies such as stimulation of root growth, increased transporter activities (Amtmann and Armengaud, 2009 ; Gojon *et al.*, 2009) and biotic interactions (Marschner, 2012), nutrient storage and further mobilization have for the most part only been studied for a few macronutrients [4], nitrogen being the most described. Recent works have suggested that in some plant species Mg deficiency induces leaf senescence (Kobayashi *et al.*, 2013) and also leaf Mg remobilization concomitant with senescence (Marschner, 2012). However, to our knowledge, a direct relationship between leaf Mg remobilization and senescence has not yet been fully demonstrated. Indeed, senescence is usually indirectly assessed through chlorosis symptoms and monitoring of decreases in the degradation of chlorophyll contents, which may not be a relevant senescence indicator because chlorophyll requires Mg for its synthesis.

An important agricultural crop, such as *Brassica napus*, usually requires high levels of nutrients, and hence fertilization, to reach an optimal yield with preservation of seed quality. Thus, *B. napus* is highly sensitive to sulfur (S) and nitrogen (N) deficiencies with negative consequences for yield and seed quality (Dubousset *et al.*, 2010) and therefore requires high doses of N and S fertilizers. These strong needs for fertilizers are partly due to the low (macro)-nutrient use efficiency (defined by the ratio of seed to plant nutrient contents) of oilseed rape. For example, it has been reported that its low N use efficiency results from a relatively inefficient endogenous N mobilization associated with non-optimal proteolysis during the leaf



senescence process (Avice and Etienne, 2014 ; Etienne *et al.*, 2007). In contrast, S remobilization from leaves to the seeds is a senescence-independent process that is associated with induction of tonoplastic sulphate transporters (especially in response to S-deficiency), allowing the mobilization of endogenous sulphate previously stored in vacuoles (Abdallah *et al.*, 2010)). Therefore, without S deficiency, S content in fallen leaves remains high at up to 2 % of dry weight (Sarda *et al.*, 2013). According to these studies, *B. napus* constitutes a relevant model with a defective agro-environmental balance for studying nutrient remobilization from leaves. Moreover, *B. napus* leaf senescence has been studied extensively (Avice and Etienne, 2014) providing efficient tools to finely monitor ongoing senescence such as the kinetics of N contents (Etienne *et al.*, 2007), and protease and anti-protease expression (Desclos *et al.*, 2008). Moreover, the genetic proximity of *B. napus* to *Arabidopsis thaliana* provides easy access to molecular tools while maintaining an agronomic relevance. Therefore, the aims of this study were to use Mg deprivation to quantify Mg remobilization from *B. napus* leaves and assess if this remobilization was senescent-dependent using relevant senescent markers. Then, we monitored if Mg deprivation had indirect impacts on the uptake of other nutrients. Finally, considering the crucial role of Mg in plant metabolism, we characterized the impact of Mg deprivation on leaf proteome expression.

## 2. Material and methods

### 2.1 Growth conditions

Seeds of *Brassica napus* var. Boheme were surface-sterilized by exposure to 80 % ethanol for 30 s followed by 20 % sodium hypochlorite for 10 min. After 10 washes with demineralized water, seeds were germinated on perlite over demineralized water for 2 days in the dark and 1 week under natural light in a greenhouse. Just after first leaf emergence, seedlings were transferred to a 20 L tank containing the following nutrient solution: 1.25 mM KNO<sub>3</sub>, 1.25 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 mM EDTA 2 NaFe, 0.01 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5 μM MnSO<sub>4</sub>, 3 μM ZnSO<sub>4</sub>, 0.7 μM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 0.1 μM CoCl<sub>2</sub>, 0.04 μM NiCl<sub>2</sub>, 0.1 mM SiO<sub>2</sub>, 1.25 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.25 mM KCl and 0.7 μM CuSO<sub>4</sub>. The control nutrient solution also contained 0.1 mM NaOH and 0.5 mM MgSO<sub>4</sub> while 0.5 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added to the Mg-depleted nutrient solution. These nutrient solutions were renewed every two days. Plants were grown under greenhouse conditions with a thermoperiod of



20°C/17°C day/night and a photoperiod of 16 h. Natural light was supplemented with high pressure sodium lamps (Philips, MASTER GreenPower T400W) supplying an average photosynthetically active radiation of 280  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  at canopy height. After one week of growth, plants were separated into 2 sets: control plants receiving normal nutrient solution and Mg-deficient plants receiving the Mg-depleted nutrient solution (for details, see above) for 25 days. Four independent samples, each consisting of three plants, were harvested at the beginning of Mg-depletion (t0) and after 25 days with (control) or without Mg (–Mg). Leaves and petioles present at the beginning of Mg-depletion (referred to as “old leaves” and “old petioles”, respectively) were distinguished from leaves appearing during Mg-depletion (referred to as “young leaves” and “young petioles”, respectively). At each date of harvest (t=0 and t=25 days), whole roots from control and Mg-depleted plants were collected. An aliquot of each tissue was weighed and dried in an oven (60°C) for dry weight (DW) determination and ground to a fine powder for IRMS and ICP-OES analysis. Thereafter, remaining fresh tissues were frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C for transcriptomic and proteomic analyses.

Every five days during the culture period, non-destructive determination of chlorophyll content of young and old leaves was performed using a SPAD chlorophyll meter (SPAD-502 model, Minolta, Tokyo, Japan). The determination was carried using three replicates of ten measurements performed on independent leaves.

## 2.2 Analysis of nutrients in plant tissues.

For the analysis of total N and S contents, an aliquot of around 4 mg DW of each plant organ sample was placed in tin capsules for total N and S analysis using an IRMS spectrometer (Horizon, Nu Instrument, Manchester, UK) linked to a C/N/S analyser (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy). Total N or S amount ( $N_{\text{tot}}$  or  $S_{\text{tot}}$ ) in a tissue “i” at a given time “t” is calculated:

$$N_{\text{tot}} \text{ (or } S_{\text{tot}}) = \% N_{i,t} \text{ (or } S_{i,t}) \times DW_{i,t} / 100$$

Other nutrients (K, Ca, S, P, Mg, Fe, Na, Mn, B, Si, Zn and Cu) were analysed by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES, Thermo Elemental Co. Iris Intrepid II XDL) with prior microwave acid sample digestion (8 mL of concentrated  $\text{HNO}_3$  and 2 mL of  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 0.5 g DW), using a protocol previously described by Mora *et al.* (2010).



Data are expressed as nutrient uptake, defined as

$$\text{Uptake}_{t25} = (\text{Nutrient amount})_{t25} - (\text{Nutrient amount})_{t0}$$

Nutrient uptake was calculated as:

$\text{Nutrient uptake}_{25d} = (\text{Nutrient amount per plant})_{25d} - (\text{Nutrient amount per plant})_{0d}$   
with the nutrient amount per plant calculated as the sum of the nutrient amount in each tissue (DW x nutrient concentration). Because it was found that Mg depletion decreased the growth rate, nutrient uptake was affected by a difference in the growth rate due to Mg depletion as well as potential nutrient interactions. Therefore, to isolate nutrient interaction effects, a theoretical uptake for each nutrient by Mg-depleted plants was calculated using the DW of Mg-depleted plants but with the nutrient concentration measured in control plants. This theoretical uptake will reflect the uptake expected from only DW production. Therefore, a higher measured nutrient uptake than the theoretical uptake in Mg-depleted plants will reveal a stimulation of uptake due to Mg depletion. In contrast, when the measured nutrient uptake is lower than the theoretical uptake, this will show a specific down regulation of nutrient uptake due to Mg depletion.

### 2.3 RNA extraction

Total RNA was extracted from 200 mg of frozen samples ground to a powder with a pestle in a mortar containing liquid nitrogen. The resulting powder was suspended in 750  $\mu\text{l}$  of extraction buffer [0.1 M TRIS, 0.1 M LiCl, 0.01 M EDTA, 1 % SDS (w/v), pH 8] and 750  $\mu\text{l}$  of hot phenol (80°C, pH 4). This mixture was vortexed for 30 s and, after addition of 750  $\mu\text{l}$  of chloroform/isoamylalcohol (24:1, v/v), the homogenate was centrifuged (15 000 g, 5 min, 4°C). The supernatant was transferred into a 4M LiCl solution and incubated overnight at 4°C. After centrifugation (15 000 g, 30 min, 4°C), the pellet was suspended in 100  $\mu\text{l}$  of sterile water. RNA was then purified with an RNeasy mini kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen, Courtaboeuf, France). Quantification of total RNA was performed by spectrophotometry at 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq, France) before Reverse Transcription (RT) and real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction (Q-PCR) analysis.

### 2.4 Reverse transcription (RT) and Q-PCR analysis

For RT, 1  $\mu\text{g}$  of total RNA was converted to cDNA with an "iScript cDNA synthesis kit" according to the manufacturer's protocol (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). Q-PCR amplifications were performed using specific primers for

**Table IV.1: Q-PCR primer sets.** *EF1 $\alpha$*  and *18S rRNA* were housekeeping genes used for relative gene expression in the Q-PCR analysis.

Gene	Accession number	Forward	Reverse
<i>EF1-<math>\alpha</math></i>	DQ312264	5'-gcctggtatgggttgacct-3'	5'-gaagttagcagcaccttg-3'
<i>18S rRNA</i>	GQ380689	5'-cggataaccgtagtaattctag-3'	5'-gtactcattccaattaccagac-3'
MGT1	NM_106738	5'-tgctccagttctcctgttc-3'	5'ccagttgaatggtgatgaaac-3'
NRAMP3	NM_127879	5'cagcaatgggtcttttggtt-3'	5'gccactggcttagcttgac-3'
IRT1	NM_119890.6	5'-gtacagctgaccgaggaagc-3'	5'tgccataaatgggttcaat-3'
ECA3	NM_100887.2	5'-tgatgagcgtcctgtagc-3'	5'-ccaccaaccaataaacgtc-3'
MOT1	NM_128127	5'-ctcgccaggatttgactta-3'	5'agatccccaacacgaacaag-3'



each housekeeping (*EF1- $\alpha$*  and *18S rRNA*) and target gene (Table IV.1). Q-PCRs were performed with 4  $\mu$ l of 200x diluted cDNA, 500 nM of primers, and 1x SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) in a real-time thermocycler (CFX96 Real Time System, Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). A 2 step program, composed of 42 cycles of a denaturing step at 95°C for 15 s followed by an annealing and extending step at 60°C for 40 s, was used for all pairs of primers (Table IV.1). For each pair of primers, a threshold value and PCR efficiency were determined using a cDNA preparation diluted >10-fold. For all pairs of primers, PCR efficiency was around 100 %. The specificity of PCR amplification was examined by monitoring the presence of the single peak in the melting curves after Q-PCRs and by sequencing the Q-PCR product to confirm that the correct amplicon was produced from each pair of primers (Eurofins, Ebersberg, Germany). The relative expression of the genes in each sample was compared with the control sample [corresponding to untreated plants at the same time of harvest] and was determined with the delta delta Ct ( $\Delta\Delta$ Ct) method using the following equation (Livak and Schmittgen, 2001):

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

with  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{treated}} - \Delta\text{Ct}_{\text{control}}$  and with  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{target gene}} - [\sqrt{(\text{Ct}_{\text{EF1-}\alpha} \times \text{Ct}_{\text{18S rRNA}})}]$

Where Ct refers to the threshold cycle determined for each gene in the exponential phase of PCR amplification and  $[\sqrt{(\text{Ct}_{\text{EF1-}\alpha} \times \text{Ct}_{\text{18S rRNA}})}]$  corresponds to the geometric average of Ct of the reference genes. Using this analysis method, relative expression of the different genes in the control sample of the experiment was equal to 1 (Livak and Schmittgen, 2001), and the relative expression of other treatments was then compared with the control on this basis.

## 2.5 Extraction and determination of total proteins

Two hundred mg of fresh matter from old leaf samples were ground to a fine powder in liquid nitrogen in the presence of 50 mg of poly(vinylpolypyrrolidone) (PVPP). The addition of PVPP is used to fix plant polyphenols that might interfere with the quantification of proteins or during separation of proteins by electrophoresis. The ground material was dissolved in 1.75 mL of TCA/acetone solution (10 % TCA (w/v) prepared in acetone). After centrifugation (3 min, 16 000 g, 4°C), the protein pellet was purified according to the protocol adapted from Wang *et al.* (Wang *et al.*, 2003). The protein pellet obtained after precipitation with TCA/acetone (10 % TCA (w/v)) was suspended in 1.75 mL of 0.1 M ammonium



acetate dissolved in 80 % methanol. After homogenization and centrifugation (16 000 g, 3 min, 4°C), the pellet was washed with 1.75 mL of 80 % acetone and centrifuged again (16 000 g, 3 min, 4°C). The supernatant was removed and the pellet was dried under vacuum (Speedvac Concentrator 5301, Eppendorf, France) for 5 min at 50°C and then suspended with 0.8 mL of phenol at pH 7.9 and in 0.8 mL of dense SDS buffer (30 % sucrose, 2 % SDS, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 % 2-β mercaptoethanol). After 5 min incubation at 4°C and centrifugation (16 000 g, 3 min, 4°C), the phenol phase was transferred to a new tube and supplemented with 1.75 mL of 0.1 M ammonium acetate and stored at -20°C overnight. Afterwards, ammonium acetate was used to precipitate proteins to enable their collection by centrifugation (16 000 g, 5 min, 4°C). The protein pellet was then washed with 1.75 mL of 100 % methanol and again with 1.75 mL of 80 % acetone. Residual acetone was removed by vacuum evaporation over a few minutes. The pellet was resuspended in 400 μL of R2D2 rehydration buffer [5 M urea, 2 M thiourea, 2 % CHAPS, 2 % N-decyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate, 20 mM dithiothreitol, 5 mM Tris (2-carboxy-ethyl) phosphine, 0.5 % IPG buffer (GE Healthcare, Saclay, France)], pH 4 to 7 (Méchin *et al.*, 2003). The total protein concentration was determined by the method previously described by Bradford (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as standard.

### 3. Two-dimensional electrophoresis (2-DE) and image analysis

2-DE was performed according to the protocol detailed by Desclos *et al.* (Desclos *et al.*, 2008) Gels were stained using the silver-staining procedure described by Blum *et al.* (Blum *et al.*, 1987) and scanned with a ProXPRESS 2D proteomic imaging system (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France). Images of the 2-DE gels were analysed using the Progenesis SameSpots software v3.0 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) according to the manufacturer's protocol. Gels from three independent biological replicates were used. Spot detection, warping, and matching were performed automatically by the software and manually validated. Artefacts due to non-specific silver nitrate staining or spots that could not be confidently verified as true matches were disregarded rather than manually edited, and misalignments were corrected by manual warping when appropriate. Mw and pI were calculated using SameSpots software calibrated with commercial



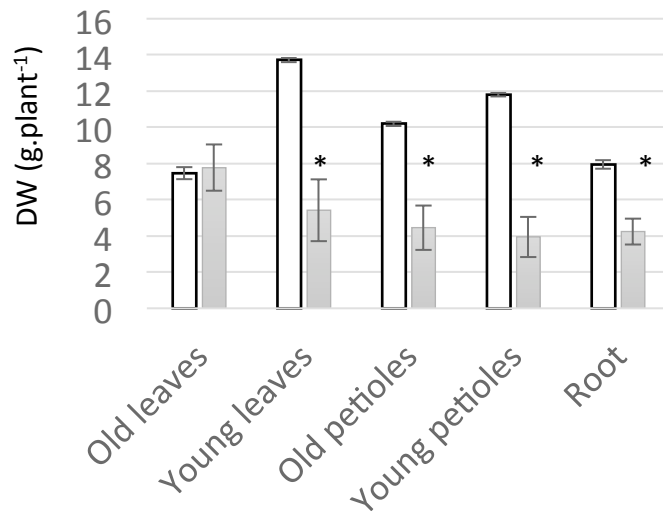
molecular mass standards (prestained precision protein standards ; Bio–Rad, Marne–la–Coquette, France) run in a separate marker lane on the 2–DE gel.

### 3.1 Protein Identification by ESI LC–MS/MS.

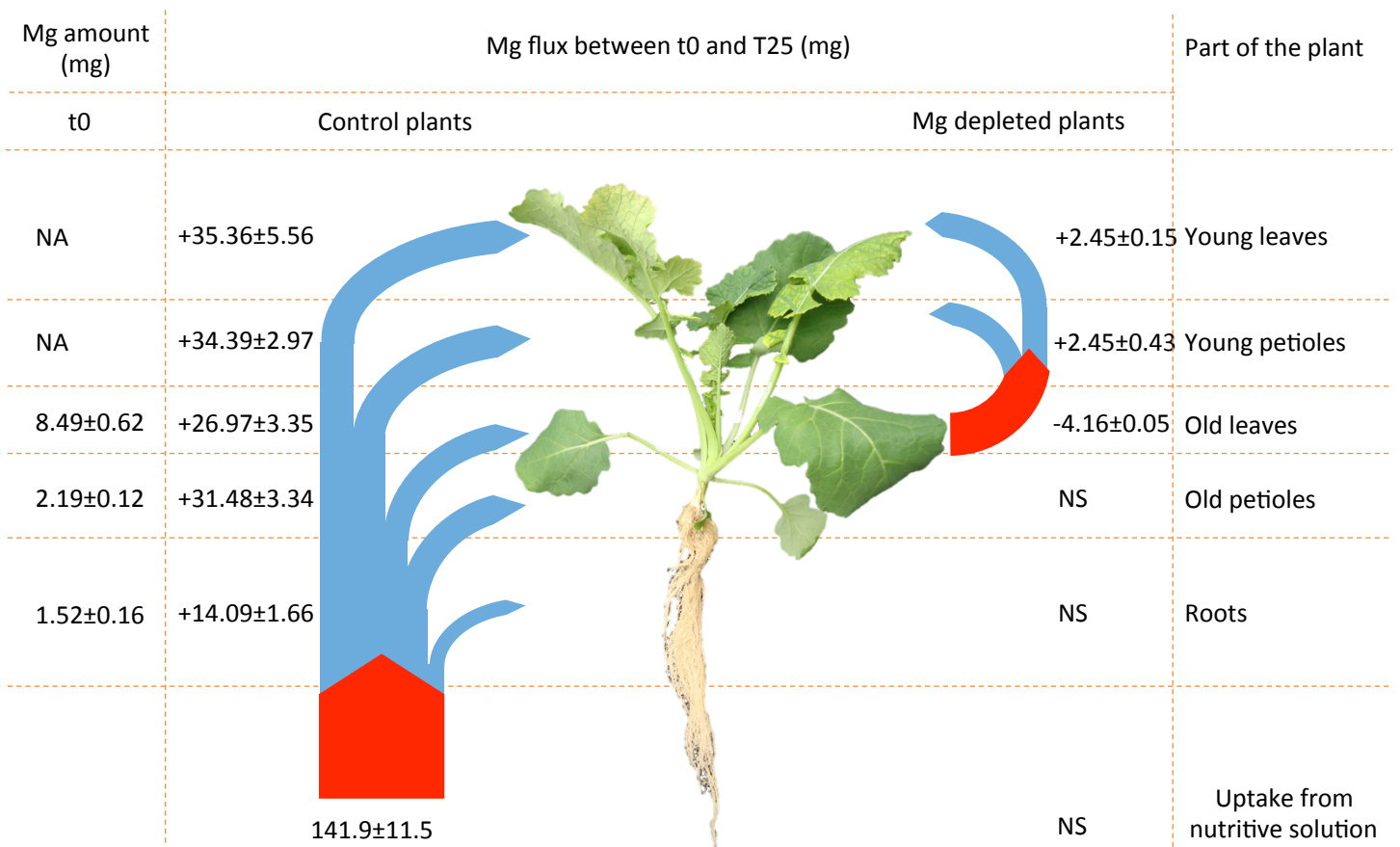
Spots of interest were excised from 2D gels and washed several times with water and dried for a few minutes. Trypsin digestion was performed overnight with a dedicated automated system (MultiPROBE II, Perkin-Elmer). The gel fragments were subsequently incubated twice for 15 min in a 0.1 % CH<sub>3</sub>CN solution in water to allow extraction of peptides from the gel pieces. Peptide extracts were then dried and dissolved in starting buffer for chromatographic elution, consisting of 3 % CH<sub>3</sub>CN and 0.1 % HCOOH in water. Peptides were enriched and separated using lab–on–a–chip technology (Agilent, Massy, France) and fragmented using an on–line XCT mass spectrometer (Agilent). The ESI LC–MS/MS data were converted into DTA– format files that were further searched for proteins with MASCOT Daemon (Matrix science). For protein identification, two strategies were employed to mine the maximum data. Measured peptides were searched in the NCBI nr–protein sequence database, *viridiplantae* (green plants (“NCBI Reference Sequence Database,”)), and in the *Brassica* EST database (*Brassica* Genome Gateway, 2007). Proteins with two or more unique peptides matching the protein sequence with a score >53 defined by MASCOT, were considered as a positive identification. The spectra of each peptide were verified manually. In cases where there was a lack of data on the identified protein, BLAST analysis was performed (“BLAST: Basic Local Alignment Search Tool,”).

### 3.2 RuBisCO relative quantification

In order to observe maximum spots, silver-staining was performed on 2-DE with a saturated RuBisCO signal. The amount of RuBisCO was then measured with an Experion Pro260 Analysis Kit (Bio–Rad, Marne–la–Coquette, France). The Experion automated electrophoresis system applies a combination of microfluidic separation technology and sensitive fluorescent detection of proteins (Bradová and Matějová, 2008). The protein extracts were treated with the Experion reagents and then separated on the Experion automated electrophoresis station according to the manufacturer’s instruction. Peak areas corresponding to large and small RuBisCO subunits were then compared using software provided by the manufacturer.



**Figure IV.1: Biomass (g. DW.plant<sup>-1</sup>) of control and Mg-depleted *Brassica napus* L..**  
\* represents significant differences at p<0.05.



**Figure IV.2: Magnesium net fluxes within different organs of control and Mg-depleted *Brassica napus* L. between d0 and d25.** Mg amounts (±SE for n=4) in different organs at t0 are indicated on the left side. Arrows are proportional to Mg fluxes (±SE for n=4). NS: not significant between d25 and d0 at p<0.05.

### 3.3 Data and statistical analysis

Regarding the analyses of growth, ICP-OES and IRMS, experiments were conducted with 4 independent biological replicates each corresponding to 3 plants. Proteomics and Q-PCR analyses were performed on 3 independent biological replicates each corresponding to 3 plants. Data are given as mean  $\pm$ SE for  $n=3$  or 4. For Q-PCR, SE and Student T-tests were based on  $\Delta\Delta Ct$  when the relation between values was still linear. According to Yuan *et al.* 2006 (Yuan *et al.*, 2006), a confidence interval of each mean value (with min and max values) could be calculated and is presented in the results section as [mean of relative expression] (Min value - Max value) with Min value =  $2^{-(\Delta\Delta Ct+SE)}$  and Max value =  $2^{-(\Delta\Delta Ct-SE)}$  (Min value =  $2^{-(\Delta Ct+SE)}$ ). Conversion of results of an exponential process into a linear comparison of amounts leads to an asymmetric distribution (Livak and Schmittgen, 2001).

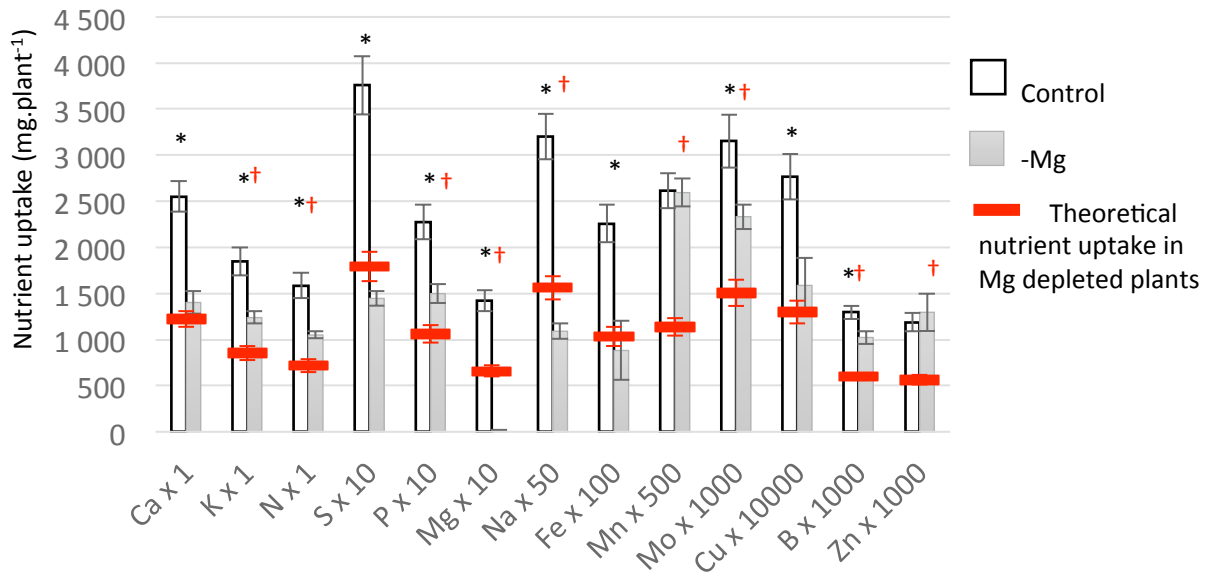
All data were analysed by Student's T test at  $p<0.05$ , except for comparison with theoretical values where it was lowered to  $p<0.01$ . Results are marked by an asterisk (\*) or cross (†) when significantly different.

## 4. Results

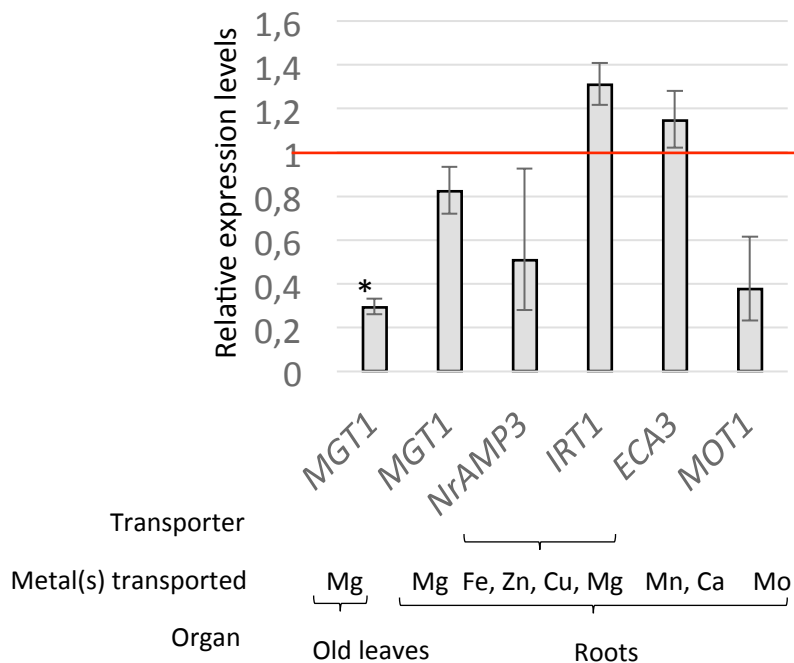
### 4.1 Mg-depletion reduces growth and Mg contents of *B. napus*

After 25d of Mg depletion, the DWs of Mg-depleted plants were 50.5 % smaller than control plants (data not shown). As presented in Figure IV.1, a significant reduction in growth between control and Mg-deprived plants was found for all organs except old leaves, for which biomass was similar to control plants. Young leaves were strongly affected with a DW reduction of 67% from  $13.7\pm 1.71$  g to  $5.42\pm 0.12$  g, followed by old and young petioles with a decrease from  $10.19\pm 1.12$  g to  $4.46\pm 0.12$  g and  $11.79\pm 1.12$  g to  $3.95\pm 0.10$  g, respectively. Root DW was  $7.94\pm 0.72$  g for control plants but only  $4.24\pm 0.23$  g for Mg-depleted plants.

During the 25d of the experiment, the amount of Mg per plant increased from  $12.20\pm 0.87$  mg to  $154.49\pm 11.45$  mg in control plants (Figure IV.2). In Mg-depleted plants, no significant difference was found between control plants at  $t_0$  ( $12.20\pm 0.87$  mg  $\text{Mg}\cdot\text{plant}^{-1}$ ) and Mg-depleted plants after 25 days ( $13.65\pm 0.48$  mg  $\text{Mg}\cdot\text{plant}^{-1}$ ), confirming the absence of significant traces of Mg in the Mg-depleted nutrient solution. As a consequence of a total lack of Mg uptake, net Mg fluxes



**Figure IV.3: Mineral nutrient uptake over 25 Days (A) and the N amount in old leaves (B) in control plants (white) and Mg-depleted *Brassica napus* L. (grey).** Red lines indicate theoretical nutrient uptake in Mg-depleted plants, and were calculated from the DW of Mg-depleted plants and from nutrient concentrations measured in control plants as explained in the Materials and Methods. Due to high differences between nutrients, a factor is attributed to each nutrient to allow representation on the same graph. A red cross (†) indicates a significant difference between theoretical and observed values at p=0.01 while an asterisk (\*) indicates a significant difference between control and Mg-depleted plants at p=0.05.



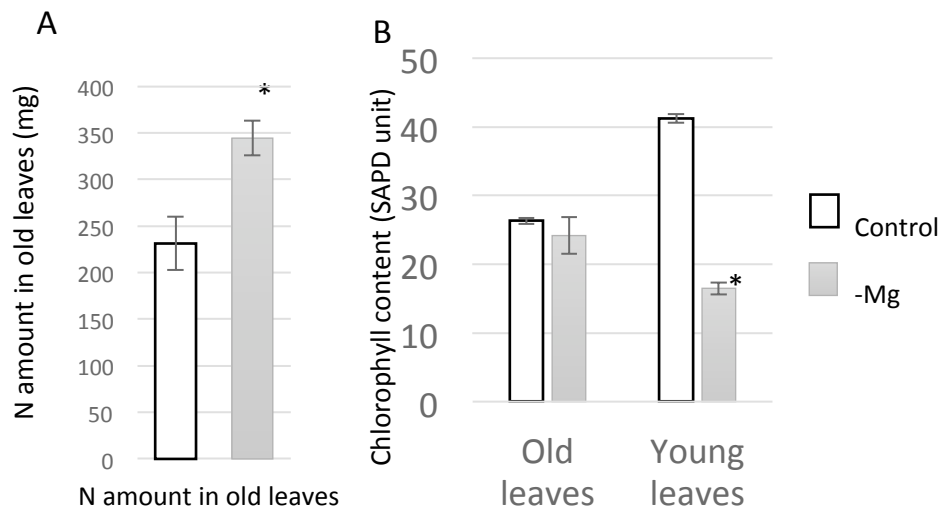
**Figure IV.4: Accumulation of transcripts of transporters in Mg-depleted *Brassica napus* L. relative to control plants:** *MGT1* ( $Mg^{2+}$ ) in old leaves, *MGT1*, *MOT1* (Mo) *IRT1* ( $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ), *NrAMP3* ( $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) and *ECA3* ( $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) in roots of *Brassica napus* L. after 25 days of culture without Mg (-Mg). \* represents significant differences at p<0.05.



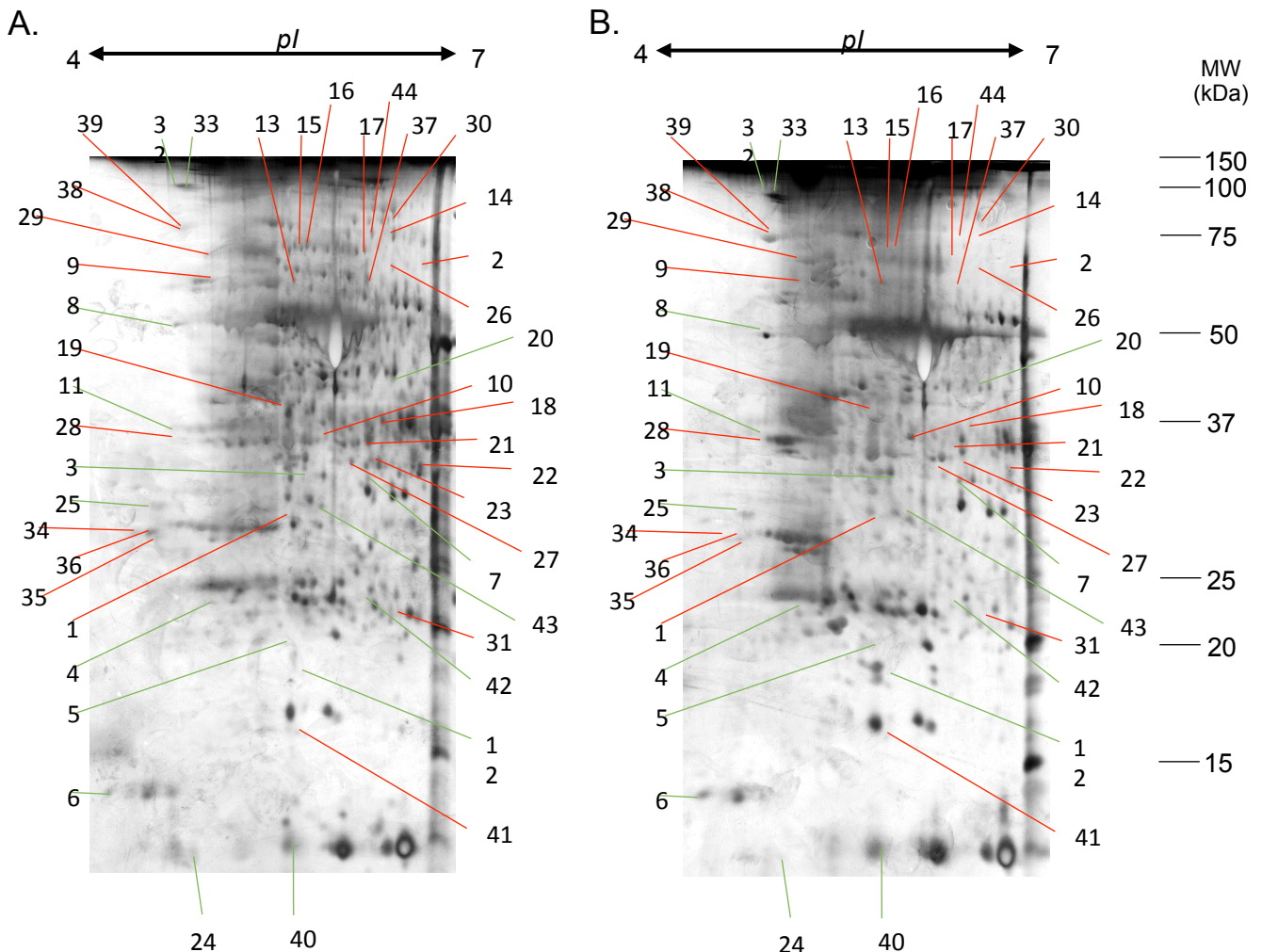
between tissues were calculated (Figure IV.2). About  $141.9 \pm 11.5$  mg of Mg were taken up by roots of control plants over 25 days, and further allocated to old petioles, old leaves, young petioles and young leaves (22.2, 19.0, 24.2 and 24.9 %, respectively of Mg taken up). In Mg-depleted plants, as previously reported, total Mg content at 25d was similar to control plants at t0, but the distribution of Mg between tissues was modified, revealing internal Mg remobilization from old leaves to young petioles and leaves. In old leaves, the Mg content dropped by 55.3 %, from  $8.49 \pm 0.62$  mg at t0 to  $4.33 \pm 0.05$  mg after 25 days of depletion (Figure IV.2). During this time period, young petioles and leaves both accumulated 2.45 mg of Mg ( $\pm 0.43$  and  $\pm 0.15$ , respectively). In contrast, Mg depletion did not affect the Mg content of roots and old petioles.

#### 4.2 Mg-depletion increased uptake of Mn and Zn independently of growth

With the large difference in DW between the two sets of plants (by about - 50.5%), nutrient uptake by Mg-depleted plants was expected to have reduced by the same order of magnitude. A theoretical nutrient uptake for Mg-depleted plants was then calculated, as explained in the materials and methods, using the DW of Mg-depleted plants and the nutrient concentration measured in control plants. Accordingly, a theoretical uptake that was close or slightly smaller (which could be explained by a time lag between growth reduction and reduced uptake) than the measured uptake by Mg-deprived plants revealed a direct effect of growth reduction. This was the case for macronutrients such as Ca and S and also for micronutrients such as Fe and Cu (Figure IV.3). Thus, the decrease in root uptake of these mineral nutrients can be directly attributed to the reduction in growth resulting from Mg deprivation. On the other hand, the amount of Na in Mg-depleted plants was less ( $21.86 \pm 1.64$  mg) than the  $31.24 \pm 1.15$  mg expected (theoretical Mg uptake in Figure IV.3). The uptake of K, N, P, Mo and B ( $1.38 \pm 0.07$  g,  $1.07 \pm 0.04$  g,  $149.80 \pm 10.10$  mg,  $2.33 \pm 0.13$  mg and  $1.02 \pm 0.20$  mg, respectively) was less than the uptake in control plants ( $1.85 \pm 0.15$  g,  $1.58 \pm 0.14$  g,  $227 \pm 18.55$  mg,  $3.15 \pm 0.29$  mg and  $1.30 \pm 0.07$  mg, respectively) but higher than expected ( $0.80 \pm 0.04$  g,  $0.66 \pm 0.03$  g,  $98.9 \pm 4.54$  mg,  $1.38 \pm 0.06$  mg and  $0.57 \pm 0.02$  mg, respectively). In contrast, and despite growth reductions triggered by Mg depletion, Zn and Mn uptake in Mg-depleted plants ( $1.30 \pm 0.20$  mg and  $5.19 \pm 0.31$  mg, respectively) were similar to control plants ( $1.19 \pm 0.10$  mg and  $5.23 \pm 0.38$  mg, respectively). So, compared to



**Figure IV.5: The nitrogen amount (A, mg N) in old leaves and chlorophyll content (B, relative Spad Units) in old and young leaves (B) of control and Mg-depleted *Brassica napus* L. between d0 and d25. \* represents significant differences at  $p < 0.05$ .**



**Figure IV.6: Representative Silver-stained 2-DE gels of proteins from old leaves of *Brassica napus* L. after 25 days of culture with (control, A) or without Mg (-Mg, B). A total of 150  $\mu$ g of total proteins was loaded onto an IEF strip forming an immobilized pH linear gradient from 4 to 7 (for details, see "Materials and Methods"). Numbers indicate sequenced and identified proteins presented in table 4. Proteins up-regulated by Mg depletion are indicated by a green line. Down regulated proteins are indicated by red lines. Molecular mass markers (MW in kDa) are listed on the right of the gel.**

uptake rates expected from the growth rate, the uptake of Zn and Mn was stimulated by about 50 % in Mg-depleted plants.

#### 4.3 Effects of Mg deprivation on root transporter transcript levels.

Following previous results, the relative expression level of the *MGT1* gene encoding a root  $Mg^{2+}$  transporter was performed. Moreover, relative expression levels were monitored for genes encoding divalent metal transporters such as IRT1 involved in uptake of  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  and NrAMP3 involved in phloem loading of  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  and  $Mn^{2+}$ . Finally, relative expression levels of the *MOT1* and *ECA3* genes (encoding Mo and  $Ca^{2+}/Mn^{2+}$  transporters, respectively) were determined. All Transcript levels were quantified in roots because all encoded transporters could have been involved in nutrient uptake. For *MGT1*, relative expression levels were also monitored in old leaves because the *MGT1* transporter could be involved in Mg remobilization. As presented in Figure IV.4, none of these genes was up- or down-regulated in Mg-depleted plants. The transcript level of the Mg transporter, *MGT1*, was even decreased in old leaves by about a third to the relative expression of 0.29 (0.26-0.33) in Mg-depleted plants (Figure IV.4).

#### 4.4 Senescence of old leaves is not induced by Mg depletion.

Because nitrogen is remobilized during leaf senescence, the amount of nitrogen could be considered as a relevant indicator of the state of leaf senescence in both conditions (Figure IV.5A). Thus, although old leaves from Mg-depleted plants showed the same dry weight as control plants (Figure IV.1) they contained a significantly higher amount of N (+49%, Figure IV.5A) suggesting a lack of mobilization of N in this tissue during Mg deprivation. The chlorophyll contents of old and young leaves were monitored using a chlorophyll meter. After 25d of treatment, (Figure IV.3B), no difference was found for old leaves (around 25 relative units in both conditions) but the chlorophyll contents of young leaves dropped from  $41.25 \pm 0.89$  to  $16.50 \pm 0.65$  spad units (Figure IV.3B). This was also supported by the fact that old leaves from Mg-depleted or control plants did not differ significantly in their RuBisCO content (data not shown).

#### 4.5 Mg depletion induces proteomic modifications

In order to identify the main metabolic changes triggered by Mg depletion, a proteomic analysis by 2-DE was performed on old leaves that were the only source of Mg mobilization (Figure IV.6). Representative 2D-gels corresponding to protein extracts from old leaves of control and Mg-depleted plants are shown in figure IV.5.

**Table IV.2: Abundance of identified proteins over- (positive value, green) or under- (negative value, red) accumulated in old leaves of Mg-depleted *B. napus* relative to control plants.** Experimental and theoretical pI / Mw, the number of LC-MS/MS matched peptides (PM), the SCORE and the percentage of sequence coverage (SC) obtained are also indicated. For each protein, the assigned best-matched protein is listed with the organism in which it was identified and its GenBank protein accession number is indicated. Elements given in notes correspond to ligand (in italic) or regulators (in bold) of the corresponding protein described in previous studies (indicated in brackets). Function is indicated following an established annotation system [49]. Cell localization was extracted from NCBI and AMIGO2 databases [33,48]. *At*: *Arabidopsis thaliana*, *Rc*: *Ricinus communis*, *Nc*: *Nicotiana tabacum*, *St*: *Solanum tuberosum*, *Gm*: *Glycine max*, *Bn*: *Brassica napus*, *Al*: *Arabidopsis lyrata*, *Br*: *Brassica rapa*, *Zm*: *Zea mays*, *Fv*: *Fragaria vesca*, *Pt*: *Populus trichocarpa*, *Bo*: *Brassica oleracea*, *Tc*: *Theobroma cacao*, *Ca*: *Cicer arietinum*, *Vv*: *Vitis vinifera*, *Bd*: *Brachypodium distachyon*, *Sa*: *Sinapis alba*, *Mp*: *Mercurialis perennis*,

Spot number	Fold change	Theoretical MW/pI	Experimental Mw/Pi	Protein	Mg-Mn binding	Function/Localization
1	-1.26	31.7/6.07	31.5/7.5	Pyridoxal biosynthesis protein PDX2 / <i>At</i> / gi 18424366		01. Metabolism / Cytosol
2	-2.55	77.1/9.14	65/6.84	Sulphite reductase [ferredoxin], putative / <i>Rc</i> / gi 255544868		01. Metabolism / Cytosol
3	1.44	41.7/8.13	35/5.92	Cysteine synthase / <i>At</i> / gi 572517		01. Metabolism / Cytosol
4	1.44	27.9/6.84	23/5.29	Oxygen-evolving enhancer protein 2 / <i>Sa</i> / gi 131391	Mn	02. Energy / Chloroplast
5	3.02	19.9/5.39	21/5.75	Photosystem I light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein / <i>Nc</i> / gi 493723		02. Energy / Chloroplast
6	1.64	10.5/4.19	14/4.92	Plastocyanin / <i>Mp</i> / gi 30272		02. Energy / Chloroplast
7	1.54	40.9/8.9	34/6.43	Ferredoxin-NADP reductase, leaf-type isozyme, chloroplast-like / <i>St</i> / gi 565392501		02. Energy / Chloroplast
8	1.48	47.5/5.46	54/4.91	Rhodanese-like domain-containing protein 4, chloroplast-like / <i>Gm</i> / gi 356560390		02. Energy / Chloroplast
9	-1.65	55.3/5.14	63/5.18	ATPA gene product / <i>Bn</i> / gi 383930459		02. Energy / Chloroplast
10	-1.54	40.1/8.13	37/6.8	ATP synthase gamma chain 1 / <i>At</i> / gi 18412632		02. Energy / Chloroplast
11	1.23	42.5/6.06	38/4.99	Sedoheptulose-bisphosphatase / <i>Al</i> / gi 297816906		02. Energy / Chloroplast
12	1.83	14.9/9.19	19/5.93	Delta subunit of ATP synthase / <i>Br</i> / gi 480014		02. Energy / Chloroplast-Mitochondria
13	-1.69	63.8/6.4	62/5.82	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase / <i>Zm</i> / gi 226498082		02. Energy / Cytosol
14	-2.38	115.9/6.21	71/5.27	Glycosyl hydrolase family 38 protein / <i>Al</i> / gi 297807421		02. Energy / Cytosol
15	-1.69	62.5/5.74	69/5.88	Phosphoglucosyltransferase, cytoplasmic-like / <i>Fv</i> / gi 470122874		02. Energy / Cytosol
16	-1.79	63.3/5.35	69/5.92	Phosphoglucosyltransferase, cytoplasmic-like / <i>Gm</i> / gi 356524354		02. Energy / Cytosol
17	-2.41	63.4/5.56	69/6.37	Phosphoglucosyltransferase 2 / <i>At</i> / gi 5223226		02. Energy / Cytosol
18	-1.57	15.7/6.81	41/6.42	Glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase / <i>Bn</i> / gi 310896467		02. Energy / Mitochondria
19	-1.62	45.0/6.20	42/5.70	Succinyl-CoA ligase beta-chain family protein / <i>Pt</i> / gi 224129596		02. Energy / Mitochondria
20	1.5	45.7/6.13	46/6.61	succinate dehydrogenase / <i>At</i> / gi 19171469	Mg-Mn	02. Energy / Mitochondria
21	-1.38	35.7/6.11	38/6.43	Malate dehydrogenase / <i>Bo</i> / gi 433335660	Mg-Mn	02. Energy / Mitochondria
22	-1.58	35.7/8.81	35/6.84	Malate dehydrogenase, mitochondrial; Precursor / <i>Bn</i> / gi 2497857	Mg-Mn	02. Energy / Mitochondria
23	-1.31	35.7/8.81	35/6.52	Malate dehydrogenase, mitochondrial; Precursor / <i>Bn</i> / gi 2497857	Mg-Mn	02. Energy / Mitochondria
24	1.5	16.5/4.69	12/4.83	Calmodulin family protein / <i>Pt</i> / gi 224074709		03. Cell growth - division / Cytosol
25	1.48	31.3/5.05	32/4.68	Uridyltransferase-related / <i>Tc</i> / gi 59062863		04. Transcription / Cytosol
26	-1.98	60.4/5.78	65/6.6	Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic-like / <i>Ca</i> / gi 502125110		05. Protein synthesis / Cytosol
27	-1.41	35.0/5.61	35/6.30	Mannose-6P reductase / <i>Ca</i> / gi 5226502		06. Prot. Dest. & Storage / Cytosol
28	-2.33	96.8/6.29	35/4.77	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase / <i>Fc</i> / gi 470115604		06. Prot. Dest. & Storage / Cytosol
29	-1.64	74.3/6.00	69/5.21	FtsH-like protein Ptf1 precursor / <i>Nc</i> / gi 4325041		06. Prot. Dest. & Storage / Cytosol
30	-2.21	76.0/5.79	74/6.56	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase / <i>Fc</i> / gi 470140059		06. Prot. Dest. & Storage / Cytosol
31	-1.68	24.6/6.88	24/6.71	Proteasome subunit beta type-1 / <i>Vv</i> / gi 225453909		06. Prot. Dest. & Storage / Cytosol
32	1.72	64.0/4.82	96/4.98	Patellin-1 / <i>At</i> / gi 15218382		07. Transporters / Cytosol
33	2.07	64.0/4.82	94/5.02	Patellin-1 / <i>At</i> / gi 15218382		07. Transporters / Cytosol
34	-1.52	24.2/4.42	29/4.62	Elongation factor 1-beta 1 / <i>At</i> / gi 15239677		08. Intracellular traffic / Chloroplast
35	-2.15	24.2/4.42	29/4.81	Elongation factor 1-beta 2 / <i>At</i> / gi 30687350		08. Intracellular traffic / Chloroplast
36	-1.6	24.2/4.42	30/4.75	Elongation factor 1-beta 2 / <i>At</i> / gi 30687350		08. Intracellular traffic / Chloroplast
37	-2.21	59.9/6.50	62/6.39	T-complex protein 1 subunit eta-like / <i>Bd</i> / gi 357148479		08. Intracellular traffic / Cytosol
38	-1.92	74.1/5.26	72/4.99	Stromal 70 kDa heat shock-related family protein / <i>Pt</i> / gi 566168226		11. Disease defence
39	-1.62	70.7/5.08	71/5.27	Heat shock cognate protein HSC70 / <i>Bn</i> / gi 2655420		11. Disease defence
40	1.37	28.0/9.20	13/5.83	Virus-resistance protein / <i>Br</i> / gi 229895642		11. Disease defence
41	-2.07	19.0/6.30	16/5.95	Copper/zinc superoxide dismutase / <i>Br</i> / gi 312837922		11. Disease defence
42	1.26	35.7/5.47	25/6.36	Chloroplast beta-carbonic anhydrase / <i>Bn</i> / gi 297787439		01. Metabolism / Chloroplast
43	1.76	35.6/8.13	31/6.03	DUF isoform 1 / <i>Tc</i> / gi 590680161		Unknown
44	-2.19	64.4/5.77	72/6.41	Carboxylate clamp-tetrapeptide repeat protein HOP2 / <i>At</i> / gi 15221564		Unknown

On each gel, 633 proteins were observed, revealing 58 spots that were up- or down-regulated by Mg depletion. After sequencing, 14 were not identifiable in the main databases. The 44 identified proteins (listed in Table IV.2) corresponded to 38 different proteins when different isoforms were taken into account. Among them, 15 proteins were up-regulated, with PSI light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein (#5) as the most up-regulated with an increase of 3.02 fold. There were 23 down-regulated proteins, with a maximum decrease of 2.55 fold observed for sulphite reductase (#2). Among the 38 different proteins, half of them are involved in energy metabolism, either in chloroplasts (OEE2, #4 for example), mitochondria (malate DH #21-23) or the cytosol (PGM #15-17). Several proteins involved in the chloroplastic electron transport chain (OEE2 ; #4, PSI light harvesting chlorophyll a/b binding protein ; #5, plastocyanin ; #6, ferredoxin-NADP reductase ; #7 and rhodanese-like domain containing protein 4 ; #8) were up-regulated. The glycolysis and TCA cycle pathways were globally down-regulated (3PGDH ; #13, PGM ; #15-17, GAPDH ; #18, Succinyl CoA ligase ; #19 and Malate DH ; #21-23) except for Isocitrate DH (#20). Three protein kinases (#28-30) and the  $\beta$ 1-Subunit of Proteasome (#31) were also down-regulated. Four disease/defence proteins were identified including T-Complex Protein (#37), HSC70 (#38) and Zn-Cu SOD (#40) that were down-regulated while Virus Resistant Protein (#41) was up-regulated.

## 5. Discussion

The main effects of Mg depletion in *Brassica napus* are summarized in Figure IV.7. Following 25 days of Mg depletion, the entire plant DW was reduced by about 50 % (Figure IV.1), affecting more specifically the roots and young tissues such as leaves and petioles (Figure IV.1). With Mg uptake being suppressed, the total amount of Mg in whole Mg-depleted plants remained the same between the beginning (0d) and the end (25d) of the experiment. However, compared to control plants, the distribution of Mg within tissues was changed in Mg-depleted plants, revealing a net remobilization of Mg from old leaves to young shoot tissues (Figure IV.2). The total Mg in old leaves was decreased by 55.3 %, which correspond to the difference of free  $Mg^{2+}$  content in leaves between Mg deficient plants compared to Mg sufficient plants (Fink and Tabingen, 1992). This suggest that the main part of the remobilized Mg come from free  $Mg^{2+}$ . In the meantime, Mg deprivation did not induce the overexpression of the gene encoding the MGT1 Mg-specific transporter

## Main results

## Conclusions

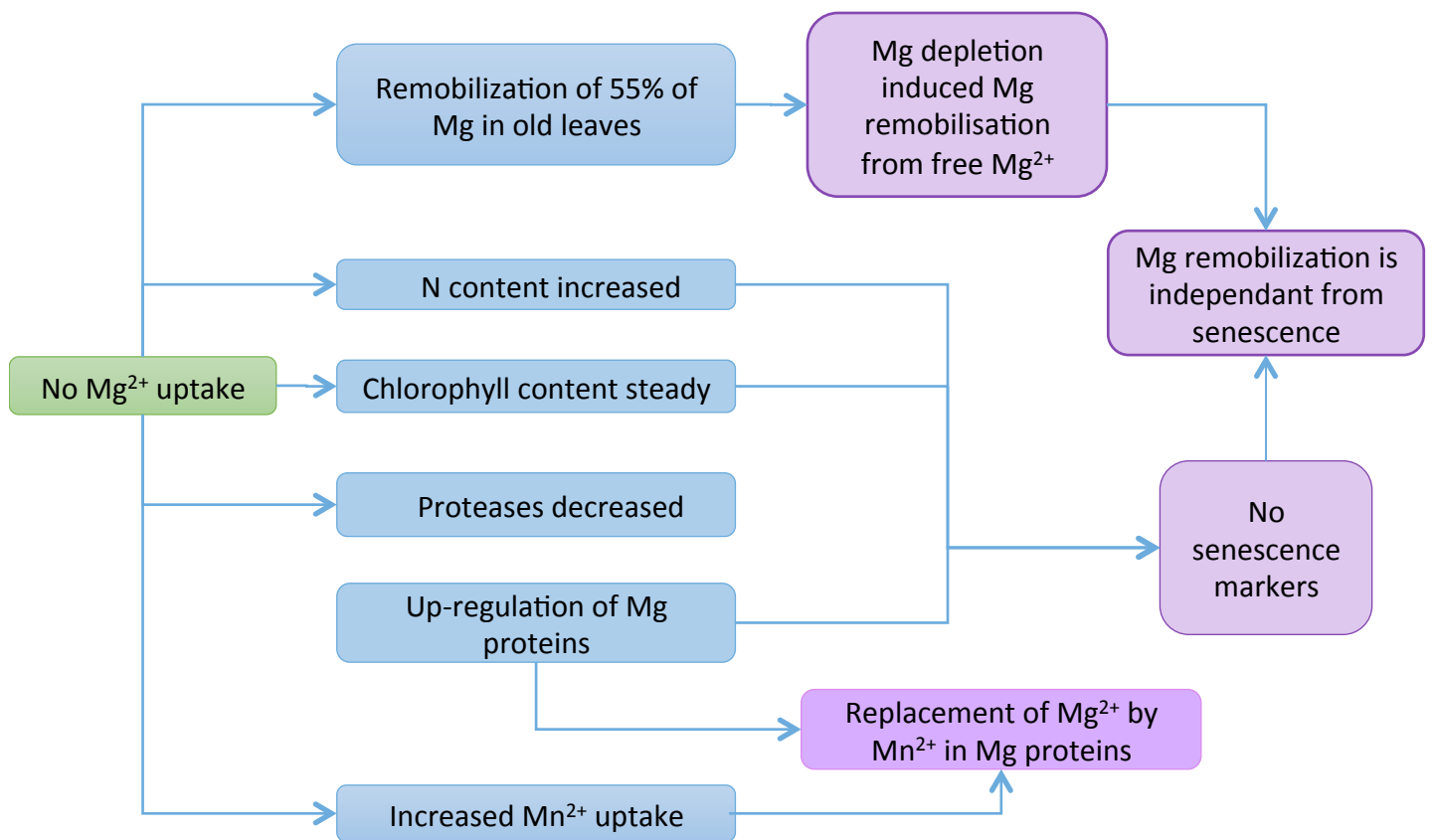


Figure IV.7: Main results and conclusions of the effects of Mg deficiency in *Brassica napus* L.

(Figure IV.5) in roots. We even observed a decrease in the number of *MGT1* transcripts in old leaves (figure IV.5), which seems surprising when taking into account the fact that *MGT1* expression has been reported to occur only in leaf trichomes (Gebert *et al.*, 2009). However, with the lack of data on Mg transporters, another role of *MGT1* in leaves is possible during remobilization. In addition to *MGT1*, the *IRT1* and *NrAMP3* genes, which encode much less specific transporters of divalent metals, were analysed but did not reveal any significant change. At the present time, Mg uptake and transport within the plant remains unclear but previous studies have reported that transcription of Mg transporters was not affected by Mg availability (Hermans *et al.*, 2010).

To observe cross-regulation between Mg deprivation and the uptake of other nutrients, 13 additional nutrients were quantified. While the uptake of most nutrients was decreased by Mg deprivation by an order of magnitude similar to or slightly smaller than the growth rate, the uptake of Mn, Mo, B and Zn were statically close to uptake rates achieved by control plants. Why Mo, B and Zn uptake was maintained at nearly the same level despite growth reduction due to Mg-depletion is difficult to explain, because it is contrary to what is known for Mn. Maintenance of Mn uptake in Mg-depleted plants was not correlated with an up-regulation of *ECA3* (Figure IV.5), but it should be kept in mind that Mn uptake could also be affected by up-regulation of the transcription of other divalent and less specific transporters (*ECA1* or *VIT1* for example, but not *IRT1* or *NrAMP3*, figure IV.5), or by an increase in activity of the *ECA3*, *IRT1* or *NrAMP3* transporters initially present. As one of the main Mn proteins, OEE2 (#4) was over represented, concomitant with Mn accumulation. Proteomic analysis also revealed that only a few Mg-dependent enzymes such as Isocitrate DH (#20) were up-regulated. The slight decrease of Mg was probably compensated for by a massive increase in Mn uptake. Indeed, it has been reported that the great majority of Mg proteins could replace the Mg atoms required for their activity by Mn (Tari *et al.*, 1997). However, despite their analogous biochemical proprieties, the two ions  $Mg^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  don't occupy the same space within the catalytic site of enzymes (ionic radius of 0.065 nm and 0.075 nm, respectively) (Marschner, 2012). Most of the time, this replacement by  $Mn^{2+}$  is also coupled with a loss of activity (Lovitt *et al.*, 2010), which is probably counter balanced in our experiment by an accumulation of these less active proteins.





For example, in the TCA cycle, isocitrate should bind  $Mg^{2+}$  before it is catalysed by Isocitrate DH into  $\alpha$ -keto-glutarate. This enzymatic reaction is one that also accepts  $Mn^{2+}$  as cofactor instead of  $Mg^{2+}$  (Sanwal *et al.*, 1964) but with less efficiency (Barratt and Cook, 1978). Accordingly, we observed an accumulation of this enzyme in Mg-depleted plants compared to control (Table IV.2). However, this counter balancing effect may not be efficient enough because repression of Malate DH (#22-24) and Succinate DH (#19) has been observed. This is probably due to a negative feedback resulting from an accumulation of metabolite upstream of the impaired Isocitrate DH reaction. Negative feedback probably occurs also in glycolysis, where PK, Enolase and PFK are Mg dependent while GAPDH (# 18) and PGM (#15-17) are down -regulated. All proteins involved in the chloroplastic electron chain transport identified in 2D-E analysis (OEE2, PSI light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein, PC, ferredoxin-NADP reductase and rhodanese-like domain-containing protein ; #4 to 8) were up-regulated by Mg depletion.

Nutrient remobilization during senescence is concomitant with the degradation of cell components, especially proteins, in order to free nutrients previously bound to these components. Proteins involved in photosynthesis and especially RuBisCO are among the first subjected to proteolysis during senescence which is usually induced by nutrient (especially N) privation (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003). However, our data showed that the amount of Rubisco in leaves was not affected by Mg depletion. Moreover, proteomics data from old leaves suggests a compensation of the lack of Mg in cells by an over-expression of proteins involved in the chloroplastic electron chain transport in order to maintain photosynthesis. Finally, the amounts of some proteases such as FTSH (#29) and the  $\beta 1$ -subunit of proteasome (#31), which are known to be induce during leaf senescence (Desclos *et al.*, 2009), were strongly up-regulated in response to Mg depletion (Table IV.2). Moreover, it has also been shown that GAPDH and Malate DH transcript levels increase during senescence (Buchanan-Wollaston, 1997 ; Kim and Smith, 1994), which goes against the decrease in these proteins (#18, 21-23) observed during Mg depletion (Table IV.2). Secondly, N content in old leaves increases in Mg-depleted plants, which negates a senescence mechanism as N tends to be remobilized as soon as senescence is induced (Malagoli *et al.*, 2005). Additionally, the chlorophyll content estimated by SPAD measurement, the amount of proteins



involved in photosynthesis and the N content were not decreased in old Mg-depleted leaves (Figure IV.1) despite Mg remobilization to young tissues from old leaves. Taken together, these data suggest that, in *Brassica napus*, the Mg mobilization induced by Mg depletion does not require induction of leaf senescence.



## CHAPITRE 5 : Une déficience en Zn induit une accumulation de Mo et de Mn et des modifications du protéome foliaire chez *Brassica napus*

---

### Avant-propos

Une expérimentation reposant sur les mêmes démarches que celles utilisées précédemment pour le Cu ou le Mg a été mise en place pour le Zn. Ainsi, nous avons souhaité **estimer la remobilisation du Zn en situation de carence en Zn chez le colza, décrire les interactions élémentaires et évaluer les modifications du protéome foliaire en réponse à cette carence..**

#### Résultats majeurs :

- **Contrairement à Cu et Mg, une carence en Zn n'induit pas de remobilisation foliaire,**
- **La carence en Zn induit une augmentation de l'absorption de Ca, N, P, Cu et dans une plus grande proportion de Mn et Mo.**

Sans remobilisation, et donc sans réduction drastique de contenu en Zn dans les tissus âgés, le nombre de protéines foliaires différenciellement exprimées est beaucoup plus faible que dans les 2 carences précédentes. Néanmoins, certains résultats sont particulièrement intéressants dans une optique de biofortification en Zn. Par ailleurs, les résultats de ionomique permettent de mieux comprendre l'impact d'une carence en Zn sur la gestion d'autres nutriments par la plante.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude a permis la rédaction d'un article intitulé «Zn deficiency in *Brassica napus* induces Mo and Mn accumulation associated with chloroplast proteins variation without Zn remobilization. », et actuellement soumis à « Plant Physiology and Biochemistry ».



**Zn deficiency in *Brassica napus* induces Mo and Mn accumulation associated with chloroplast proteins variation without Zn remobilization**

Vincent Billard<sup>1,2,3</sup>, Anne Maillard<sup>1,2,3</sup>, Maria Garnica<sup>4</sup>, Florence Cruz<sup>5</sup>, José-Maria Garcia-Mina<sup>4</sup>, Jean-Claude Yvin<sup>5</sup>, Alain Ourry<sup>1,2,3</sup>, Philippe Etienne<sup>1,2,3,6</sup>

1. Normandie University, Caen, France
2. UNICAEN, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, F-14032 Caen, France
3. INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, F-14032 Caen, France
4. Timac Agro Spain, Poligono de Arazuri-Orcoyen Calle C n°32, 31160 Orcoyen, Spain
5. Centre de Recherche International en Agrosience, CRIAS-TAI, Groupe Roullier, 55 boulevard Jules Verger, 35800 Dinard, France
6. Corresponding author: philippe.etienne@unicaen.fr, phone: +33 231 565 374, fax: +33 231 565 360.

**Keywords**

Zinc deficiency, ionic, proteomic, molybdenum, manganese





## Abstract

The importance of Zn has been of little concern in human nutrition despite a strong decrease of this element in crops since the rise of high yielding varieties. For better food quality, Zn biofortification could be used, but will be optimal only if mechanisms governing Zn management are better known. Using Zn deficiency, we were able to demonstrate that Zn is not remobilized in *B. napus*. Thus, remobilization processes should not be targeted by biofortification strategies. This study also complemented previous work by investigating leaf responses to Zn deficiency, especially from proteomic and ionomic points of view, showing for example, an increase in Mn content and of the Mn-dependent protein, Oxygen Evolving Enhancer.

## Abbreviations

DW: Dry Weight, IRMS: Isotope-Ratio Mass Spectrometry, ICP-OES: Inductively coupled plasma optical emission spectrometry, NCED4: Nine Cis Epoxy-carotenoid Dehydrogenase 4, PDI: Protein disulfide Isomerase, PDH: Pyruvate Dehydrogenase, IDH: Isocitrate DH, HSC70: Heat Shock Complex 70kDa, TPI: Triose Phosphate Isomerase, VAR3: Variegate 3, GCSH: Glycine Cleavage System H, GCC: Glycine Cleavage Complex, DHAP: Dihydroxy Acetone Phosphate, GAP: Glyceraldehyde Phosphate, F1-6BP: Fructose-1,6-Bis-Phosphate, OEE: Oxygen Evolving Enhancer, MoCo: Molybdenum Cofactor.



## 1 Introduction

Although macronutrients like C, N and S have been a focal point in agricultural management, micronutrients have been paid far less attention. However, according to the World Health Organization (Allen *et al.*, 2006), two billion people around the world suffer from micronutrient deficiencies, causing 7.3 % of disease burden.

Among the micronutrient deficiencies in humans, severe zinc (Zn) deficiency causes symptoms such as immune defects and growth retardation (Hambidge, 2000). However, most of the symptoms induced by Zn deficiency can be attributed to other environmental factors present during diagnosis and therefore a role for Zn deficiency is likely to have remained hidden. Indeed, Zn deficiency was long considered as non-existent in humans with the first hypothesis on Zn deficiency arising only in 1961 (Prasad *et al.*, 1961). Importantly, Zn is involved in lymphocyte development and differentiation (Shankar and Prasad, 1998). As a consequence, a mild Zn deficiency can have an impact on concomitant infections such as diarrhoea (Sazawal *et al.*, 1995), pneumonia (Bhutta *et al.*, 1999), malaria (Caulfield *et al.*, 2004) or AIDS (Siberry *et al.*, 2002). Thus, masked by the infection, Zn deficiency is ignored. Moreover, no biomarkers to monitor Zn deficiency have been identified that are simpler to handle than measuring Zn levels in the blood. In response, Zn supplementation in food has been suggested for avoiding deficiencies.

However, over the past 60 years, harvest quality (*i.e.* the micronutrient contents such as Fe, Cu, Mg and Zn content) has been reduced despite sufficient micronutrient amounts in the soil, and this is the result of varietal selection that aimed to achieve higher yields (Fan *et al.*, 2008 ; Garvin *et al.*, 2006). In addition, many poor soils can lack Zn resulting in dramatic effects on agriculture. Thus, Zn deficiency affects yield and quality of harvest with either direct or indirect negative impacts on human nutrition (Alloway, 2013 ; Andersen, 2007). Biofortification could be an option to increase Zn in foods, but it requires more knowledge, especially concerning Zn management in plants.

Due to its capacity to form tetrahedral complexes with N-, O- and particularly S-ligands, Zn plays a functional and structural role in a large number of enzyme reactions in plants and in other organisms (Vallee and Auld, 1990). Indeed, bioinformatics studies have revealed that 9% of eukaryotic proteins are likely Zn dependent (Andreini *et al.*, 2009). Numerous transcription factors contain a Zinc



finger domain that needs Zn ions to bind a specific DNA sequence in order to initiate and promote transcription (Klug, 2010). For example, the C2H2 family (characterized by a specific sequence motif containing 2 cysteins and 2 histidines) contains the majority of the Zn finger proteins with 176 different proteins. Zn-Cu superoxide dismutase also needs a Zn atom in its functional core to detoxify free radicals in cells (Abreu and Cabelli, 2010). Moreover, a lot of other key proteins are known to be regulated by Zn, such as Fructose 1,6 bisphosphatase (K. Shrotri *et al.*, 1983).

Previous high scale studies on Zn deficiency have mainly used transcriptomic approaches, showing a high impact of Zn deficiency on the regulation of transcription factors. However, while Zn finger proteins are numerous they represent only 0.7% of the total amount of proteins.

*Brassica napus* is an important agricultural crop that needs high levels of macronutrients (especially nitrogen (N) and sulphur (S)) to reach high yields. Thus, *B. napus* is highly sensitive to S and N deficiency with negative consequences for yield and seed quality (Dubousset *et al.*, 2010). As a consequence, high doses of N and S fertilizers are usually used to avoid these losses of yield and the quality of harvest products. This strong need for fertilizers is partly due to the low (macro)-nutrient use efficiency (defined by the ratio of seed to plant nutrient contents) of oilseed rape. For example, the low N use efficiency is especially due to an inefficient endogenous N mobilization (Avice and Etienne, 2014 ; Desclos *et al.*, 2008 ; Etienne *et al.*, 2007) associated with leaf senescence during the vegetative stage. According to these studies, *B. napus* constitutes a relevant model with a defective agro-environmental balance that might be improved. Moreover, its genetic proximity to *Arabidopsis thaliana* provides easy access to molecular tools while maintaining an agronomic relevance.

Therefore, the aim of this study is to better understand the effect of Zn deficiency on *B. napus* growth and remobilization of endogenous Zn. Moreover, an ionic approach has been used to monitor the effect of Zn-deficiency on the uptake of a selection of macro- and micro-nutrients. Finally, a proteomic approach has been performed to identify the main metabolic pathways affected by Zn deficiency.



## 2. Material and methods

### 2.1 Growth conditions

Seeds of *Brassica napus* var. Boheme were surface-sterilized by exposure to 80 % ethanol for 30 s followed by 20 % sodium hypochlorite for 10 min. Then, they were germinated on perlite over demineralized water for 2 days in the dark and 1 week under natural light in a greenhouse. Just after first leaf emergence, seedlings were transferred to a 20 L tank containing the following nutrient solution: 1.25 mM KNO<sub>3</sub>, 1.25 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 mM EDTA, 2NaFe, 0.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.01 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5 μM MnSO<sub>4</sub>, 0.7 μM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 0.1 μM CoCl<sub>2</sub>, 0.04 μM NiCl<sub>2</sub>, 0.1 mM SiO<sub>2</sub>, 1.25 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.25 mM KCl, and 0.7 μM CuSO<sub>4</sub>. Control nutrient solution also contained 0.1 mM NaOH and 3 μM ZnSO<sub>4</sub> while 3 μM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added to the Zn-deficient nutrient solution. These nutrient solutions were renewed every two days. Plants were grown under greenhouse conditions with a thermoperiod of 20°C/17°C day/night and a photoperiod of 16 h. Natural light was supplemented with high pressure sodium lamps (Philips, MASTER GreenPower T400W) supplying an average photosynthetically active radiation of 280 μmol photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> at canopy height. After one week of growth, plants were separated into 2 sets: control plants receiving normal nutrient solution and Zn-deficient plants receiving the Zn-deficient nutrient solution (for details, see above) over 25 days. Four independent samples each consisting of three plants were harvested at the beginning of Zn-depletion (t<sub>0</sub>) and after 25 days with (control) or without Zn (-Zn). Leaves and petioles present at the beginning of Zn-depletion (referred as “old leaves” and “old petioles”, respectively) were distinguished from leaves appearing during Zn-depletion (referred as “young leaves” and “young petioles”, respectively). At each date of harvest (t=0 and t=25 days), whole roots from control and Zn-deficient plants were collected. An aliquot of each tissue was weighed and dried in an oven (60°C) for dry weight (DW) determination and ground to fine powder for IRMS and ICP-OES analysis. Remaining fresh tissues were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for proteomic analyses.

### 2.2 Analysis of nutrients in plant tissues.

An aliquot of around 4 mg DW of each plant organ sample was placed in tin capsules for total N and S analysis using an IRMS spectrometer (Isoprime, GV Instrument, Manchester, UK) linked to a C/N/S analyser (EA3000, Euro Vector,





Milan, Italy). The total amount of N or S ( $N_{\text{tot}}$  or  $S_{\text{tot}}$ ) in a tissue “i” at a given time “t” is calculated as:

$$N_{\text{tot}} \text{ (or } S_{\text{tot}}) = \% N_{i,t} \text{ (or } S_{i,t}) \times DW_{i,t} / 100$$

Other nutrients (K, Ca, S, P, Mg, Fe, Na, Mn, B, Si, Zn and Cu) were analysed by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES, Thermo Elemental Co. Iris Intrepid II XDL) with prior microwave acid sample digestion (8 mL of concentrated  $\text{HNO}_3$  and 2 mL of  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 0.5 g DW), using a protocol previously described by Mora *et al.* (2010).

Data are expressed as nutrient uptake, defined as:

$$\text{Uptake}_{t25} = (\text{Nutrient amount})_{t0} - (\text{Nutrient amount})_{t25}$$

A theoretical nutrient amount was estimated for Zn-deficient plants considering their nutrient content and the difference of biomass between control and Zn-deficient plants.

$$\text{Uptake-Zn-theo} = [(\text{Nutrient amount})_{\text{Control}} \times (\text{MS-Zn}/\text{MS}_{\text{control}})] - (\text{Nutrient amount})_{t0}$$

### 2.3 Analysis of proteome

Protein extraction and 2-DE have been performed according to the protocol detailed in Desclos *et al.* (2008). Gels were stained using the silver-staining procedure described by Blum *et al.* (1987) and scanned with the ProXPRESS 2D proteomic imaging system (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France). Images of the 2-DE gels were analysed using the Progenesis SameSpots software v3.0 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) according to the manufacturer’s protocol. Gels from three independent biological replicates were used. Spot detection, warping and matching were performed automatically by the software and manually validated. Mw and *pI* were calculated using SameSpots software calibrated with commercial molecular mass standards (prestained precision protein standards ; Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) run in a separate marker lane on 2-DE gel. Spots of interest were excised from 2D gels and analysed following D’Hooghe *et al.* (2013).

### 2.4 Data and statistical analysis

Regarding growth, ICP-OES and IRMS analyses, experiments were conducted with 4 independent biological replicates each corresponding to 3 plants. Proteomics and Q-PCR analyses were performed on 3 independent biological replicates each corresponding to 3 plants. Data are given as mean  $\pm$ SE for n=3 or 4.

**Table V.1: Biomass and Zn content in *B. napus* L. at t=0 and after 25 days of culture with (control) or without Zn (-Zn). \* and † represent significant differences at p<0.05 compared to t=0 and control, respectively. NA: Not Applicable.**

		t0	control	-Zn
Old leaves	Zn (µg)	88.8±6.1	143.6±19.2*	70.2±6.1*†
	DW (g)	2.13±0.14	4.78±0.57*	5.44±0.53*
Young leaves	Zn (µg)	NA	584.1±3.2	65.4±2.7†
	DW (g)	NA	12.70±0.71	6.00±0.09†
Old petioles	Zn (µg)	17.2±1.1	122.4±11.5*	56.3±5.8*†
	DW (g)	0.63±0.03	8.07±0.44*	6.51±0.64*
Young petioles	Zn (µg)	NA	104.7±12.8	29.0±8.4†
	DW (g)	NA	10.02±0.60	5.27±0.67†
Roots	Zn (µg)	46.2±3.9	397.8±41.3*	109.9±7.8*†
	DW (g)	0.48±0.03	4.11±0.17*	4.16±0.25*
Total	Zn (µg)	152.3±10.5	1352.7±52.3*	330.8±24.0*†
	DW (g)	3.23±0.20	39.67±0.95*	27.38±0.89*†

All data were analysed with Student's test ( $p < 0.05$ ) and marked by an asterisk (\*) or cross (†) when significantly different.

### 3. Results and discussion

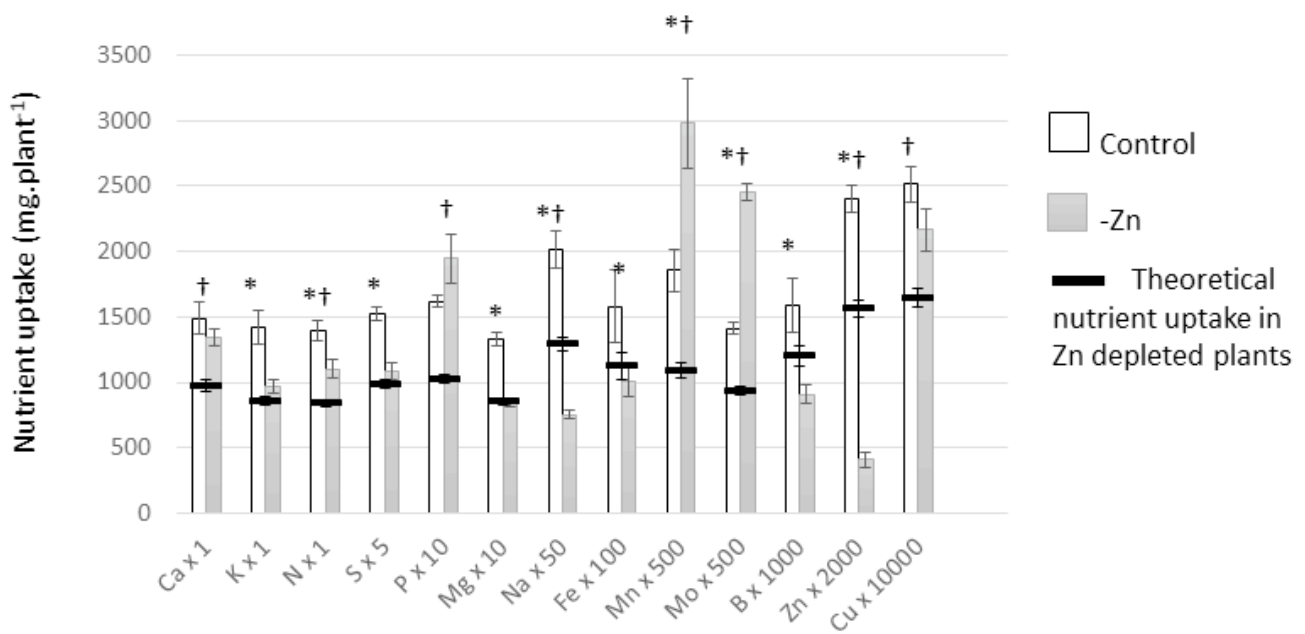
#### 3.1 Zn is not remobilized during Zn depletion in *B. napus*.

Zn depletion was assessed through measurement of the amount of Zn within plants (table V.1). Before the depletion, plants contained  $152.3 \pm 10.5 \mu\text{g}$  of Zn. At the end of the experiment, control plants contained  $1352.7 \pm 52.3 \mu\text{g}$  of Zn and Zn-deficient plants only  $330.8 \pm 24.0 \mu\text{g}$ , confirming the deficiency. The low increase in the Zn amount in Zn-deficient plants (between  $t_0$  and day 25) was due to traces of Zn contamination in the demineralized water used for the nutrient solutions. Compared to control plants, the Zn amount in Zn-deficient plants was reduced by 50% in old leaves, from  $143.6 \pm 16.2 \mu\text{g}$  to  $70.2 \pm 6.1 \mu\text{g}$ , and by over 70% in roots (from  $397.8 \pm 41.3 \mu\text{g}$  to  $109.9 \pm 7.8 \mu\text{g}$ ) and young petioles (from  $104.7 \pm 12.8 \mu\text{g}$  to  $29.0 \pm 8.4 \mu\text{g}$ ). In old petioles, control plants accumulated  $122.4 \pm 11.5 \mu\text{g}$  of Zn while Zn-deficient plants only contained  $56.3 \pm 5.8 \mu\text{g}$  of Zn. Young leaves recorded the greatest drop with a decrease of 87% (from  $584.1 \pm 3.2 \mu\text{g}$  in control plants to  $65.4 \pm 2.7 \mu\text{g}$  in Zn-deficient plants).

Compared to  $t_0$  plants, no Zn decrease was observed in old tissues despite Zn depletion. This indicates that *B. napus* is unable to remobilize Zn during Zn depletion, contrary to the previous observations for N (Etienne *et al.*, 2007), S (Abdallah *et al.*, 2010) and Cu (Billard *et al.*, in press).

Concomitant with this fall in the amount of Zn amount at the whole plant level, the Zn-deficient plants were 30% smaller than the control plants. Interestingly, this difference in DW at the whole plant level was only due to the young tissues, with a decrease for young petioles from  $10.02 \pm 0.60 \text{ g}$  in control plants to only  $5.27 \pm 0.67 \text{ g}$  in Zn-deficient plants. In young leaves, DW decreased by more than 50%, dropping from  $12.70 \pm 0.71 \text{ g}$  to  $6.00 \pm 0.09 \text{ g}$ .

The strong decrease in the biomass of young tissues is logical given that the lowest amount of Zn in Zn-deficient plants was observed in the young leaves and young petioles. These tissues did not have any stocks of Zn, in contrast to the old tissues, and they had no means of obtaining any Zn by remobilization from older tissues due to an absence of Zn mobility.



**Figure V.1: Mineral nutrient uptake over 25 Days (A) and the N amount in old leaves (B) in control (white) and Zn-deficient plants (grey).** Black lines indicate the theoretical nutrient uptake in Zn-deficient plants, and were calculated from the DW of Zn-deficient plants and from nutrient concentrations measured in control plants as explained in the Material and Methods. Due to large differences between nutrients, a factor is attributed to each nutrient to allow representation on the same graph. A red cross (†) indicates significant difference between theoretical and observed values at  $p=0.01$  while an asterisk (\*) indicates significant difference between control and Zn-deficient plants at  $p=0.05$ .

### 3.2 Zn-depletion increased the uptake of Mn and Mo

Because it was found that Zn depletion decreased the growth rate by 30% (table V.1), nutrient uptake was affected by this difference in growth rate due to Zn depletion as well as potential nutrient interactions. Therefore, to isolate the effect of nutrient interactions, a theoretical uptake by Zn-deficient plants was calculated for each nutrient, using the DW of Zn-deficient plants and the respective nutrient concentration measured in control plants (for details, see Material and Methods section). This theoretical uptake will reflect the uptake expected if DW was identical.

The K, S, Mg, Fe and B uptake in Zn-deficient plants ( $970.1 \pm 48.1$ ,  $216.6 \pm 12.1$ ,  $84.9 \pm 3.0$ ,  $10.1 \pm 1.2$  and  $0.9 \pm 0.1$  mg.plant<sup>-1</sup> respectively) were decreased compared to control plants ( $1410.7 \pm 131.9$ ,  $303.7 \pm 10.2$ ,  $132.8 \pm 5.2$ ,  $15.8 \pm 2.8$  and  $1.6 \pm 0.2$  mg.plant<sup>-1</sup> respectively) but this was consistent with expected values considering the DW drop (Figure V.1). The N amount in Zn-deficient plants was  $1102.1 \pm 73.7$  mg.plant<sup>-1</sup> which is higher than expected ( $836.65 \pm 25.6$  mg.plant<sup>-1</sup>) but still less than in control plants ( $1391.2 \pm 80.2$  mg.plant<sup>-1</sup>). The amounts of Ca, P and Cu were similar to control plants despite the DW loss. The amount of Na was  $15.1$  mg.plant<sup>-1</sup>, which makes it the only element that decreased more than expected ( $25.8 \pm 1.0$  mg.plant<sup>-1</sup>) among all the nutrients monitored. Surprisingly the Mn amount was  $6.95 \pm 0.68$  mg.plant<sup>-1</sup> in Zn-deficient plants, which is much higher than in control plants ( $4.70 \pm 0.32$  mg.plant<sup>-1</sup>).

The Mo amount was also strongly up-regulated in Zn-deficient plants and reached  $5.23 \pm 0.13$  mg.plant<sup>-1</sup>, whereas it was  $3.14 \pm 0.01$  mg.plant<sup>-1</sup> in control plants (Figure V.1). Mo regulation has been poorly described and the identification of Mo transporters is recent. Mo is mainly used in the Molybdenum Cofactor (MoCo), which is essential for key enzymes such as nitrate reductase and aldehyde oxidase (Hänsch and Mendel, 2009). It has been suggested that the protein CNX1, previously described as Zn dependent (Llamas *et al.*, 2006) and involved in the incorporation of Mo in the MoCo (Mendel, 2013), could act as a Mo sensor and could regulate Mo content (Tejada-Jiménez *et al.*, 2009), especially during the Zn deficiency performed in this study.

### 3.3 Zn depletion induces proteomic modifications

Modification of metabolism in young leaves of Zn-deficient plants seemed dramatic but it was difficult to determine the mechanisms involved as the deficiency

#	Fold change	Theoretical MW/Pi	Experimental MW/Pi	Protein name/organism/accession number	Function/localisation	Interaction
1	7.05	30.3/5.49	30/5.68	Chitinase class 4-like protein / <i>Bn</i> / gi 14486393	11. Disease/Defence / Cyt	Zn
2	1.80	39.6/6.35	43/6.04	NAD+ dependent isocitrate DH subunit 2 / <i>At</i> / gi 1766048	02. Energy / Mit	Zn
3	-1.5	43.0/7.59	42/6.49	Pyruvate DH complex E1 alpha subunit / <i>Br</i> / gi 157849684	02. Energy / Cyt	Zn
4	1.88	26.7/5.09	26/5.4	Triosephosphate isomerase / <i>At</i> / gi 15226479	02. Energy / Cyt	
5	2.60	55.3/5.14	57/6.65	ATPase subunit 1 / <i>Bn</i> / gi 112253900	02. Energy / Chlo-Mit	
6	2.11	55.7/5.00	62/4.99	Protein disulfide isomerase 1 / <i>Bc</i> / gi 77999356	05. Protein synthesis / Rib	Zn
7	2.56	55.7/5.00	65/5.17	Protein disulfide isomerase 1 / <i>Bc</i> / gi 77999356	05. Protein synthesis / Rib	Zn
8	3.66	55.7/5.00	62/5.08	Protein disulfide isomerase 1 / <i>Bc</i> / gi 77999356	05. Protein synthesis / Rib	Zn
9	3.20	55.7/5.00	62/5.04	Protein disulfide isomerase 1 / <i>Bc</i> / gi 77999356	05. Protein synthesis / Rib	Zn
10	1.76	70.7/5.08	73/5.27	Heat shock cognate protein HSC70 / <i>Bn</i> / gi 2655420	08. Intracellular traffic / Chlo	Zn
11	2.12	55.3/5.19	62/4.85	ATP synthase CF1 alpha subunit / <i>At</i> / gi 7525018	02. Energy / Chloroplast-Mit	Zn
12	1.36	55.3/5.19	65/4.87	ATP synthase CF1 alpha subunit / <i>At</i> / gi 7525018	02. Energy / Chloroplast-Mit	Zn
13	2.33	24.7/9.12	17/4.9	Peroxyredoxine-2E / <i>At</i> / gi 15231718	11. Disease/Defence / Cyt	
14	1.98	17.8/5.11	16/4.71	Glycine cleavage system H protein 2 / <i>At</i> / gi 15223217	01. Metabolism / Mit	GCC (Zn)
15	1.72	78.7/5.98	80/6.45	Glycyl-tRNA synthetase 1 / <i>Vv</i> / gi 225456501	01. Metabolism / Mit	
16	-1.5	39.6/7.71	31/6.13	Hypothetical protein EUTSA v10004495mg / <i>Es</i> / gi 557091344	13. Unclassified / Unknown	
17	-1.7	65.6/6.42	69/6.5	Nine cis epoxycarotenoid dehydrogenase 4 / <i>At</i> / gi 1766048	01. Metabolism / Cyt	VAR3 (Zn)
18	1.39	35.1/5.93	30/4.94	Oxygen-evolving enhancer protein 1-2 / <i>At</i> / gi 15230324	02. Energy / Chlo	Mn
19	-1.5	62.2/6.30	42/6.47	Mirosinase / <i>Bn</i> / gi 127733	11. Disease/Defence / Cyt	Zn
20	1.54	33.3/6.12	37/5.96	ATP synthase gamma chain chlo. recursor / <i>At</i> / gi 5708095	02. Energy / Chlo	Zn
21	2.15	24.1/9.33	18/5.42	FabZ / <i>At</i> / gi 27808536	01. Metabolism / Cyt	

**Table V.2: Abundance of identified proteins over- (positive value) or under- (negative value) accumulated in old leaves of Zn-deficient *B. napus* relative to control plants.** Experimental and theoretical pi / Mw are indicated. For each protein, the assigned best-matched protein is listed with the organism in which it was identified and its GenBank protein accession number is indicated. Function is indicated following the annotation system from The EU Arabidopsis Genome Project et al. (1998). Cell localisation was extracted from NCBI and AMIGO2 databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/> and <http://amigo.geneontology.org/amigo>). Cyt: cytosol, Mit: mitochondria, Chlo: chloroplast, rib: ribosome, GCC: Glycine Cleavage Complex. *Bn*: *Brassica napus*, *At*: *Arabidopsis thaliana*, *Br*: *Brassica rapa*, *Bc*: *Brassica carinata*, *Vv*: *Vitis vinifera*, *Es*: *Eutrema salsugineum*.

strongly reduced development of these organs. We chose to focus on old leaves, which did not present any differences in biomass despite a decrease in the Zn content by 45% compared to control plants, and should then have presented compensations for the Zn depletion. Proteomic analysis revealed 693 spots on 2D-E gels, corresponding to the 693 most abundant protein isoforms in the old leaves (unshown data). Among them, 22 were differentially expressed (table V.2). One of the 22 could not be identified by Mascott. The 21 remaining are presented in table 3 and corresponded to 17 different proteins. Five proteins were down-regulated by Zn deficiency with NCED4 (#17) as the most repressed (-1.7 fold). Among the 12 up-regulated proteins, Chitinase (#1) showed the highest increase (7.05 fold). Among the 17 proteins differentially regulated, PDI (#6-9), PDH (#3), IDH (#2), HSC70 (#10), ATP synthase gamma chain (#20) and ATP synthase CF1 alpha (#11,12) (Tan *et al.*, 2010), Chitinase (#1) (Billman, 1986) and Myrosinase (#19) (Liang *et al.*, 2006) were previously described to bind or to be regulated by Zn. Moreover, a previous transcriptomic study performed on roots of *Arabidopsis thaliana* described an up-regulation of Chitinase and HSC70 transcripts in Zn-stressed plants (van de Mortel *et al.*, 2008). Another proteomic study also performed on roots of *Arabidopsis thaliana* grown with Zn excess ( $[Zn] > 300 \mu M$  in nutritive solution) described an under expression of PDI and TPI (Fukao *et al.*, 2009). Taken with the results described in the present study (PDI #6-9 and TPI #4, table V.2), this evidence suggests a constant repression of these proteins by Zn. However, this transcriptomic study under Zn excess also showed that IDH was over expressed under excess Zn, which is the same as in our study under Zn deficiency (#2 table V.2). Taken together, these data suggest that IDH would be up-regulated when the Zn concentration deviates from an optimal value.

Among the non-Zn proteins, we noted 2 enzymes that are directly above and below Zn enzymes in their metabolic pathways. The enzyme, NCED4 (# 17), binds the Zn protein, VAR3, in a protein complex to metabolize zeaxantin into chloroplast derived apocarotenoid, in the carotenoid synthesis pathway (Næsted *et al.*, 2004). In the same way, in the glycine biogenesis pathway, folates are metabolized into glycine within the glycine cleavage complex, a multiprotein complex containing GCSH, which was up-regulated 1.98 fold (#14). A previous study indicated an inhibition of the whole glycine cleavage complex activity that was associated with an increase in Zn (Hiraga and Kikuchi, 1982), thus linking GCSH and Zn. Glycine is





next processed to glycyl tRNA by Glycyl tRNA synthase, which was also found to be up-regulated 1.72 fold (#15 table V.2). The last example of a possible indirect regulation by Zn would be TPI, which metabolizes DHAP into GAP in the glycolysis pathway. It is located after the reaction metabolized by F1-6BP aldolase and before GAPDH, which are both Zn enzymes (Tan *et al.*, 2010). Finally, because OEE (#18, table2) (a protein involved in water hydrolysis in PSI complexes in thylakoids) requires a Mn atom to be active (Heide *et al.*, 2004), the increase in Mn content (figure V.1) in the Zn-deficient plants described above (section 3.2.) is likely to be correlated with the 40% increase in OEE.



## CHAPITRE 6 : Discussion générale

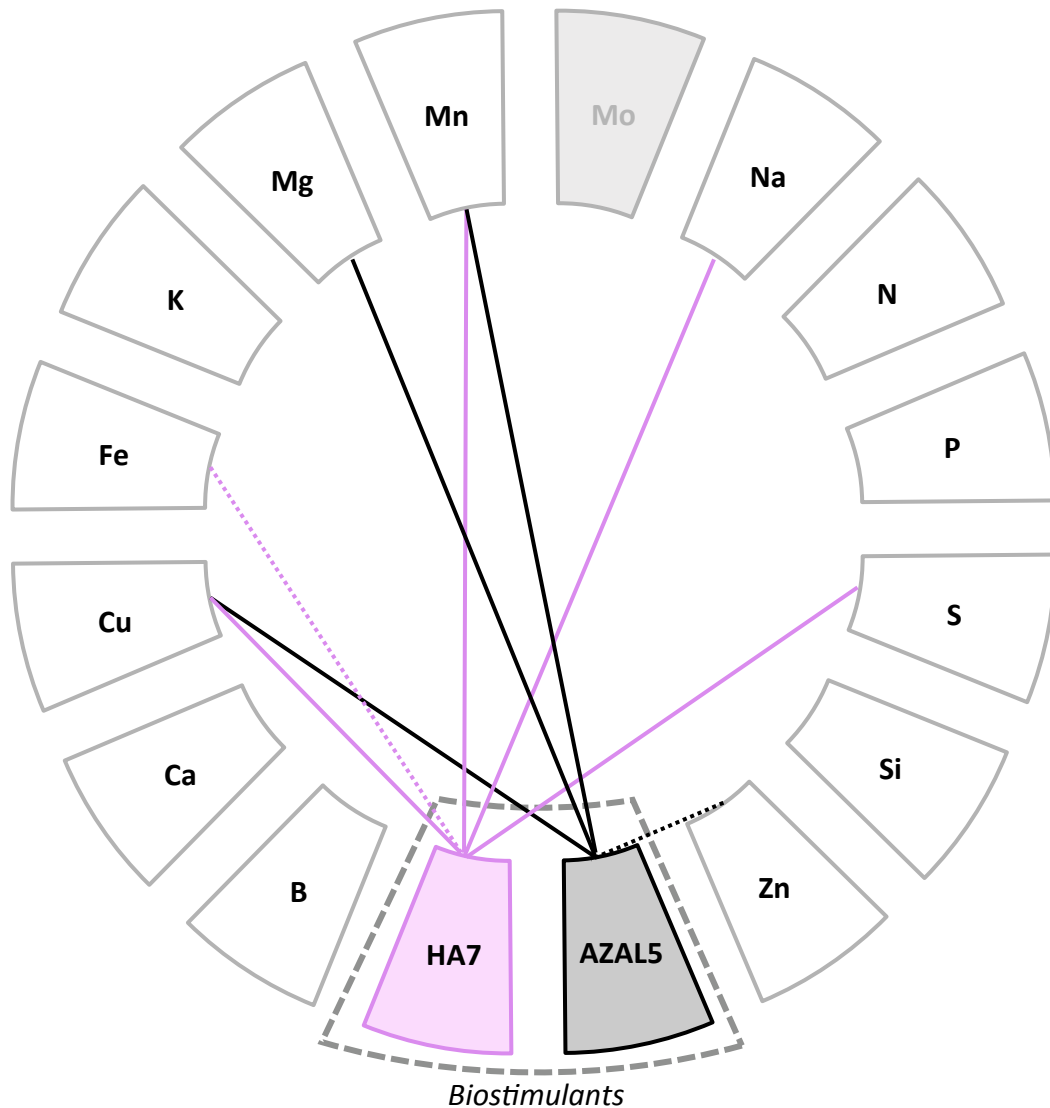
Considérant d'une part, la perte de qualité des récoltes enregistrées lors des 4 dernières décennies en matière de contenu en micronutriments (Fan *et al.*, 2008), il devient important de biofortifier les plantes de grande culture en Fe, Mg, Cu et Zn afin de réduire l'occurrence des déficiences (voire de carences) en ces quatre éléments à l'origine de « faim cachée » dans les populations humaines.

L'amélioration du contenu en nutriments (notamment Fe, Zn, Mg et Cu) dans les parties comestibles des plantes notamment par biofortification devient donc une nécessité pour contrebalancer la sélection négative involontaire qui a été réalisée conjointement à la sélection variétale visant à améliorer le rendement. Afin d'atteindre ces objectifs de biofortification des végétaux, deux leviers majeurs nous sont apparus comme devant être privilégiés : l'absorption optimale des nutriments d'intérêt et leur remobilisation depuis les tissus anciens vers les tissus en croissance et *in fine* vers les tissus récoltés des plantes.

Pour optimiser l'absorption des micronutriments d'intérêt, l'utilisation de biostimulants, présentant l'avantage de pouvoir prétendre à biofortifier les cultures rapidement sans générer de perturbation environnementale majeure, a été privilégiée. Dans un second axe de recherche, nous avons étudié la remobilisation des micronutriments d'intérêt afin de déterminer si ce processus pouvait constituer un levier d'action potentiel pour biofortifier les produits récoltés.

Ainsi, ce travail de thèse visait à :

- Evaluer la possibilité d'utiliser des biostimulants AZAL5 et HA7, précédemment décrits (Janin *et al.*, 2012 ; 2013) comme ayant des effets bénéfiques sur l'absorption et le métabolisme de l'azote et du soufre chez le colza, pour biofortifier des végétaux en Fe, Zn, Cu et Mg. Pour ce faire, des apports racinaires de chacun des deux biostimulants ont été réalisés sur des cultures hydroponiques de colza. Lors des 30 jours de traitement, les plantes ont été récoltées de façon cinétique et le contenu élémentaire des tissus végétatifs (parties aérienne et racinaire) a été déterminé et comparé à celui de plantes témoins n'ayant pas été en contact avec l'extrait. Cette stratégie s'inscrit dans une biofortification à court et



**Figure VI.1:** Interactions élémentaires mises en évidence chez le colza après traitement par deux biostimulants (AZAL5 et HA7). Les secteurs colorés correspondent aux différentes expérimentations: traitement par AZAL5 (gris) ou HA7 (rose). Chaque trait plein indique une augmentation significative de l'absorption de l'élément, relativement au témoin non traité par l'un ou l'autre des traitements. Un trait pointillé indique augmentation significative, relativement au témoin non traité, de la translocation de l'élément des racines vers les feuilles. Pour des raisons techniques, le Mo n'a pas été mesuré au cours de ces expérimentations.

moyen terme pour venir en substitution ou en complément des stratégies à plus long terme telles que l'amélioration et la création variétale.

- Etudier l'importance de la remobilisation des micronutriments Zn, Cu et Mg chez le colza, afin de déterminer si l'efficacité de remobilisation de ces éléments peut constituer un critère pertinent à prendre en compte dans les programmes d'amélioration et de création variétale visant à obtenir des variétés biofortifiées en un ou plusieurs de ces 3 micronutriments. Pour ce faire, nous avons observé la remobilisation apparente chez des colzas soumis à des carences en Zn, Cu ou Mg pendant 25 jours.

Par ailleurs, lors de cette seconde expérimentation (carences), nous avons utilisé des approches physiologiques et moléculaires afin de mieux appréhender les principales voies métaboliques impactées par une carence en Zn, Cu ou Mg. L'un des objectifs de ces travaux était de vérifier si la remobilisation éventuelle de ces éléments nécessitait (cas de l'azote, (Etienne et al., 2007)) ou non (cas du soufre, (Abdallah et al., 2010)), l'intervention de protéases associées à la sénescence foliaire. Dans ce cadre, nous avons quantifié l'expression d'indicateurs usuels de la sénescence (comme les teneurs en chlorophylles, en Ribulose 1,5 Bis-Phosphate Carboxylase-Oxygénase (RuBisCO) ou encore l'expression de protéases, par exemple). Par ailleurs, au moyen d'analyses multi-élémentaires, nous avons cherché à déterminer si une carence en Cu, en Zn ou en Mg conduisait à des perturbations/interactions entre éléments. Les résultats obtenus lors de ces études permettront aussi de compléter l'étude des 2 biostimulants, en s'assurant que la biofortification observée pour le Cu, le Zn et le Mg n'était pas une conséquence indirecte d'une perturbation affectant un autre élément nutritif.

## 1 AZAL5 et AH7, deux biostimulants efficaces sur l'absorption et la translocation de certains nutriments

Comme nous l'avons présenté au sein du premier chapitre des résultats, les deux biostimulants AZAL5 et HA7 induisent un certain nombre d'effets bénéfiques semblables, en particulier une meilleure croissance et une meilleure nutrition minérale des plantes traitées (Figures II.1 et V.1). En effet, bien qu'ils n'augmentent pas l'apport en nutriments dans la solution nutritive (sauf pour le Na, Figure II.3) chez le colza, HA7 augmente l'absorption du Cu, mais aussi du Mn, du Na et du S



alors qu'AZAL5 favorise l'absorption du Cu, du Mg et du Mn (Figure VI.1). Avec ces 2 biostimulants, à une augmentation de l'absorption du Cu est associée, même de façon transitoire, un nombre de transcrits plus élevé du transporteur COPT2 (Figures II.6A et B) impliqué dans l'absorption racinaire du Cu (Puig and Peñarrubia, 2009). Cette augmentation de l'absorption peut résulter d'une augmentation de l'expression de certains transporteurs mais peut aussi être accentuée par une augmentation de la surface racinaire. En effet, la croissance racinaire des plantes était aussi fortement stimulée par ces deux apports (+102% pour AZAL5 et +88% pour HA7) mais cela n'a pas pour effet d'augmenter dans une proportion identique l'absorption de tous les éléments minéraux (comme c'est le cas pour les éléments du groupe 2 dont font partie, par exemple, N et P, Figure II.1). Compte-tenu de ces résultats, il peut être suggéré l'effet de ces deux biostimulants sur la biomasse racinaire pourrait être particulièrement bénéfique en conditions de plein champs en améliorant la prospection racinaire de la plante dans des sols où la disponibilité en éléments minéraux peut-être fluctuante. A titre d'exemple, une meilleure prospection racinaire permettrait un accès plus facile aux ions peu mobiles tels que  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  et  $Cu^{2+}$  et accroîtrait leur absorption en condition de plein champ (par rapport aux plantes non traitées), en agissant sur la disponibilité spatiale en nutriments. Une telle hypothèse mériterait d'être testée à l'avenir puisque les expérimentations que nous avons réalisées en hydroponie (renouvellement régulier de la solution nutritive, pas de limitation nutritionnelle) constitue un contexte particulier sans hétérogénéité spatiale.

Nous avons montré par ailleurs qu'AZAL5 favorise la translocation du Zn des racines vers les parties aériennes de la plante alors que HA7 augmente la translocation du Fe vers les feuilles (Figures II.2 et VI.1). Dans les deux cas, cette stimulation de la translocation du Zn ou du Fe est associée à l'augmentation du nombre de transcrits de NRAMP3 (Figures II.6E et F), transporteur d'ions divalents impliqué dans l'efflux depuis la vacuole et donc dans la translocation des ions  $Fe^{2+}$  et  $Zn^{2+}$  depuis cet organite cellulaire vers d'autres organes. En conséquence, il peut-être suggéré que l'induction de ces transporteurs spécifiques pourrait favoriser le chargement phloémique de ces deux éléments (Lanquar *et al.*, 2005). Par ailleurs, les données présentées dans le chapitre 4 des résultats concernant le Zn, de même que les résultats préliminaires obtenus avec le Fe (non montrés) suggèrent que le Zn





et le Fe ne présentent pas de remobilisation foliaire même en situation de carence. Il semble donc que l'accroissement des tissus récoltables en Zn ou en Fe, ne puisse être obtenu que par une augmentation de l'absorption racinaire et une translocation de ces éléments depuis les racines vers les feuilles. Les effets d'AZAL5 et de HA7 sur la stimulation de la translocation du Zn et du Fe, des racines vers les feuilles du colza, n'en sont que plus intéressants.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés durant le développement végétatif du colza. Une meilleure absorption ou utilisation des nutriments à ce stade permettrait à la plante d'avoir une biomasse et des teneurs optimales en nutriments, et ce, avant la formation et le remplissage des grains. Il pourrait être alors suggéré que les graines de ces plantes pourraient avoir des teneurs en Cu, Mg, Zn et Fe supérieures aux graines provenant de plantes témoins non traitées. Cette hypothèse devrait toutefois être testée avec l'utilisation de culture permettant d'aller jusqu'au stade de maturation des graines.

Si les effets bénéfiques de ces deux biostimulants sur la nutrition minérale du colza sont avérés et indéniables, il n'en reste pas moins difficile d'expliquer leur origine. A titre d'exemple, dans leurs travaux, Janin *et al.* (2012 ; 2013) ont montré que les extraits AZAL5 et HA7 contenaient de très faibles quantités d'hormones (IAA et ABA pour AZAL5, cytokinines pour HA7) et pour certaines à des niveaux non quantifiables (cytokinines pour AZAL5, IAA et ABA pour HA7), invalidant ainsi l'hypothèse de l'intervention de ces phyohormones dans la régulation des mécanismes d'absorption.

## 2. En situation de carence, le colza mobilise le Cu et le Mg mais pas le Zn.

Dans le but d'une biofortification à long terme, la solution idéale reste la sélection de variétés ayant une meilleure gestion des micronutriments, que ce soit du point de vue de l'absorption ou de la remobilisation. En ce sens, nous devons améliorer nos connaissances, à ce jour lacunaires, sur cette gestion des micronutriments par les plantes. Parmi les deux mécanismes ciblés, la remobilisation est aujourd'hui le mécanisme le plus délaissé dans les études agronomiques, au contraire de l'absorption qui est largement étudiée (Marschner, 2012). La remobilisation constitue pourtant un levier à ne pas négliger, notamment



parce qu'elle participe au remplissage des grains malgré même lorsque l'absorption minérale de la plante est limitée. A ce titre, il peut-être suggérer qu'une remobilisation maîtrisée et/ou optimisée des microéléments d'intérêt pourrait constituer une stratégie privilégiée pour améliorer la qualité nutritionnelle des produits récoltés. Au cours de nos travaux sur la remobilisation, nous avons fait le choix de nous affranchir de l'absorption car la remobilisation apparente est i) soit en partie cachée par l'absorption (cas de l'azote, Etienne *et al.*, (2007)), soit ii) inhibée en présence suffisante de l'élément nutritif (exemple du soufre, Abdallah *et al.*, (2010)). Nous avons donc eu recours à des cultures de colza en condition de carences en Zn, Cu et Mg, ce qui nous a permis de quantifier la remobilisation nette de ces microéléments sans avoir à recourir à des marquages isotopiques.

Quelques rares études portant sur la remobilisation de ces 3 éléments nutritifs ont été réalisées. Par exemple, lors de la sénescence, les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* remobilisent le Zn et le Cu à hauteur de 60% ainsi que 15% du Mg (Himmelblau and Amasino, 2001). Cependant, l'efficacité de remobilisation d'un élément donné peut varier d'une espèce à l'autre (A. Maillard, communication personnelle), voire entre différents génotypes d'une même espèce, comme l'ont montré Yang *et al.*, (2009). Ces auteurs décrivent, par exemple, une efficacité de remobilisation du Mg au cours de la sénescence (définie par la différence entre les quantités de Mg dans une feuille avant sénescence et après sénescence) allant jusqu'à 24,5% chez un génotype de *Panicum vergatum*, alors que certains génotypes continuent d'accumuler du Mg au cours de la sénescence (jusqu'à +187%). Il convenait donc dans un premier temps de quantifier la remobilisation des 3 microéléments chez le colza.

Parmi les trois éléments étudiés, seuls le Mg et le Cu présentent une remobilisation apparente chez le colza lors d'une carence de 25 j en Mg ou en Cu, respectivement. En revanche, après une période de déficience en Zn de 25 jours, le Zn n'est pas remobilisé (Tableau V.1). Ce résultat diffère de ce qui a été précédemment observé chez le blé, où le Zn peut être remobilisé entre les différents organes (Erenoglu *et al.*, 2011). Il semble donc que la remobilisation du Zn soit dépendante de l'espèce. Nous avons aussi pu constater que cette absence de remobilisation du Zn chez le colza occasionne une croissance atypique durant la carence : la biomasse des tissus âgés était peu affectée alors que le développement



des tissus jeunes ayant émergé lors de la carence (et de ce fait totalement privés de Zn), était très fortement restreint (Tableau V.1).

Au cours de ces travaux, nous avons estimé que 61,4% du Cu présent dans les feuilles présentes au moment de l'application de la carence sont remobilisés vers les jeunes feuilles, émergées au cours des 25j de carence (Tableau III.2). La remobilisation du Cu est associée à l'accumulation de transcrits de transporteurs de Cu tels que *COPT2* et *HMA1* (Figure III.2). Ces observations réalisées chez *B. napus* sont en accord avec les précédents travaux réalisées chez *A. thaliana* (del Pozo *et al.*, 2010). De même, environ 50% du Mg présent dans les feuilles présentes au début d'une carence en Mg sont remobilisés vers les tissus en formation lors de la carence. Par contre, une carence en Mg ne semble pas induire de surexpression de gènes codants des transporteurs spécifiques du Mg tels que *MGT1*, ce qui avait été déjà été démontré chez *Arabidopsis thaliana* par d'autres auteurs (Hermans *et al.*, 2013).

La remobilisation évaluée au cours de ces travaux est en réalité une remobilisation apparente (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Cette approche ne permet pas discriminer la provenance des nutriments dans les tissus en formation (remobilisation ou absorption). Or, si dans deux carences sur trois (Mg et Zn) nous avons pu nous affranchir de l'absorption, il n'en est pas de même pour le Cu. En effet, dans le cas de cette expérimentation, la remobilisation est probablement sous-estimée à cause d'une très légère contamination lors de la culture, liée à la qualité de l'eau osmosée utilisée pour l'élaboration des solutions nutritives. Ainsi, même si la remobilisation foliaire de Cu chez le colza est ainsi avérée, elle est toutefois probablement sous-estimée. Une étude fine de la remobilisation nette aurait nécessité l'emploi d'isotopes stables, tels que le  $^{54}\text{Fe}$ , le  $^{70}\text{Zn}$  ou le  $^{65}\text{Cu}$  (Pottier *et al.*, 2014), technique très lourde et qui a donc été délaissée.

Les taux de remobilisation apparente sont d'environ 50 et 60% pour Mg et Cu, respectivement, ce qui est loin d'être négligeable. Il apparaît donc que la remobilisation est processus majeures prendre en compte dans l'optique d'une future biofortification des végétaux en ces deux éléments. L'étape suivante consisterait à déterminer s'il existe une la variabilité génotypique pour ces processus de



remobilisation, afin d'utiliser les variétés ayant la meilleure efficacité de remobilisation lors de futurs programmes de sélection variétale.

### 3. La remobilisation du Cu et du Mg est probablement indépendante de la sénescence.

Dans la littérature, il est usuellement admis que la remobilisation des éléments est généralement liée à la sénescence. En effet, dans le cycle de vie normal d'une plante (*i.e.* sans carence), l'entrée en sénescence correspond, pour la feuille, à la transition d'un comportement d'organe puits (importation nette d'éléments nutritifs) à celui de source (exportation nette) (Pottier *et al.*, 2014). Toutefois, cette conception générale est directement reliée à l'état général des connaissances pour un élément majeur tel que l'azote, pour lequel la remobilisation est synchrone et fonctionnellement connectée à la sénescence. L'augmentation de la remobilisation foliaire de cet élément est d'ailleurs accrue lors d'une carence, cette dernière conduisant par ailleurs à une entrée en sénescence plus précoce. (Etienne *et al.*, 2007). En revanche, pour le S, Abdallah *et al.*, (2010) ont montré que la sénescence n'était pas induite en cas de carence en S dès lors que les tissus avaient suffisamment de réserve et en particulier de sulfate. Pour les autres éléments minéraux, les études publiées sont inexistantes ou parcellaires. Par exemple, en ce qui concerne le Mg, Kobayashi *et al.* (2013) décrivent la simultanéité de la remobilisation du Mg et de la sénescence chez *Oryza sativa* et Baszyński *et al.* (1980) rapportent une chute des teneurs en chlorophylles lors d'une carence en Mg chez *Brassica napus*. De même, Erenoglu *et al.* (2011) ont montré une remobilisation du Zn depuis les feuilles vers les graines lors d'une stimulation de la sénescence induite par l'obscurité. Mais ces travaux ne fournissent que peu d'indications fonctionnelles sur l'induction de la sénescence par une carence en Mg ou en Zn.

La sénescence foliaire est indissociable d'une diminution du contenu en azote dans les feuilles (Etienne *et al.*, 2007), ainsi que d'une dégradation des petites et grandes sous-unités de la RuBisCO, complexe enzymatique impliqué dans la fixation du dioxyde de carbone lors de la phase sombre de la photosynthèse (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003) et une diminution de la teneur en chlorophylles (Matile *et al.*, 1996). En réponse à une carence en Cu ou en Mg, aucun de ces paramètres ne s'est avéré significativement différent entre les feuilles des plantes

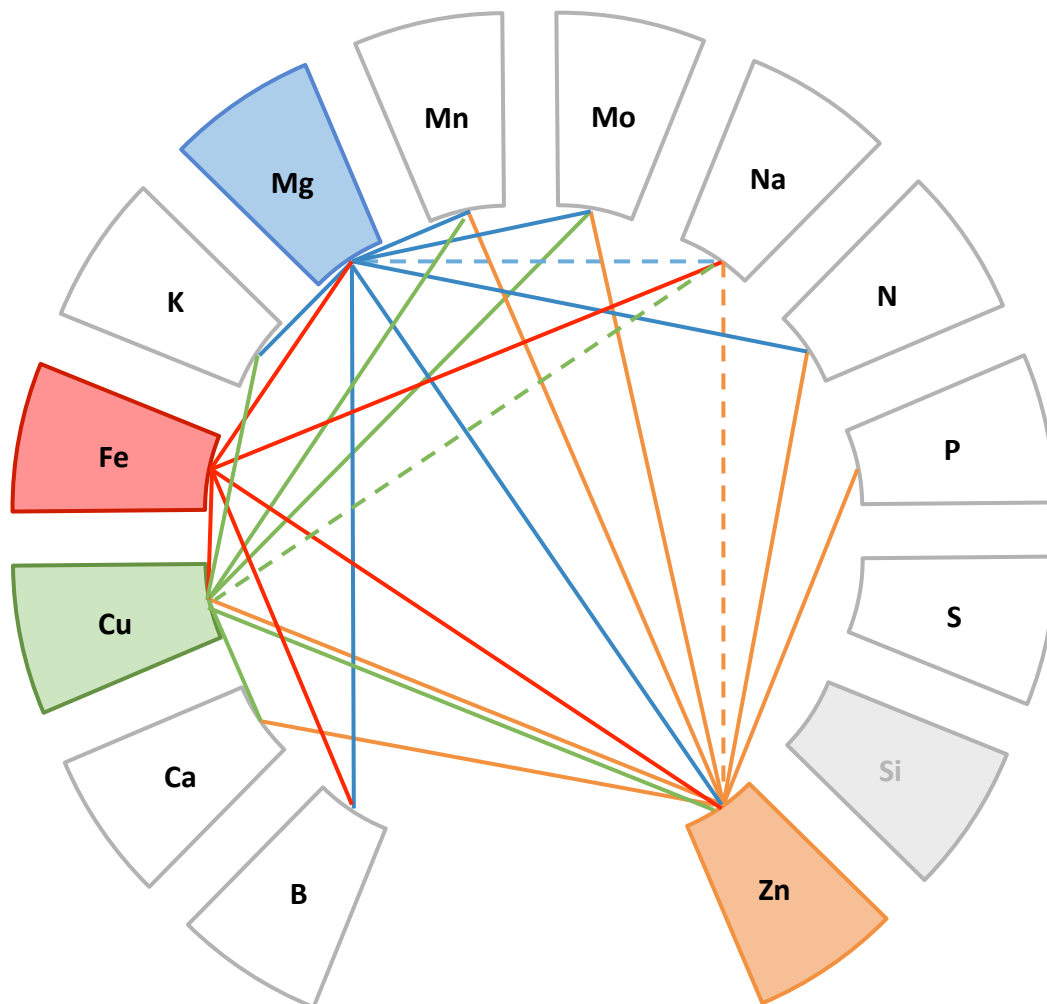




carencées remobilisant le Mg (Figure IV.5) ou le Cu (Figure III.1) et les feuilles des plantes témoins qui ne remobilisent pas.

Au niveau cellulaire, la remobilisation du Cu et du Mg peut s'expliquer soit par une mobilisation des formes libres et/ou une mobilisation de ces éléments après action préalable de protéases (associées à la sénescence) impliquées dans la dégradation de métalloprotéines Cu et Mg dépendantes. Toutefois, les observations fournies par l'analyse du protéome des feuilles mobilisatrices ne montrent pas d'induction de protéase spécifique. Au contraire, dans ces études, il a été montré que les protéines connues pour être impliquées dans la protéolyse associée à la sénescence foliaire du colza (Desclos *et al.*, 2009) sont soit absentes, soit réprimées (FTSH2, lors d'une carence en Cu (Tableau III.3), FTSH et la sous unité  $\beta$ 1 du protéasome lors d'une carence en Mg (Tableau IV.2)). De plus, tant pour la carence en Cu que pour celle en Mg, les données protéomiques n'indiquent aucune diminution drastique de la quantité de protéines dépendantes de ces éléments dans les feuilles âgées, et ce malgré la remobilisation. Au contraire, dans la carence Cu (Tableau III.3), nous avons relevé une augmentation des protéines Cu-dépendantes telles que l'anhydrase carbonique  $\beta$  et la Malate DH (Giulia *et al.*, 2012 ; Tan *et al.*, 2010). Ainsi, l'expression de l'apoprotéine ne serait pas dégradée pour libérer leurs cofacteurs Mg ou Cu, mais serait au contraire surexprimée en réponse à une chute de la teneur en Cu ou Mg qui induirait une diminution de l'activité enzymatique. Pris dans leur ensemble, ces travaux montrent que la remobilisation du Cu et du Mg ne serait pas sénescence-dépendante et que la réallocation du Cu ou du Mg libre serait privilégiée et antérieure à toute dégradation de protéines Cu- ou Mg-dépendantes.

L'hypothèse d'une remobilisation indépendante de la sénescence est intéressante dans le sens où la feuille peut mobiliser une partie de ses réserves sans pour autant dramatiquement perturber son cycle de vie, ce qui permettrait une remobilisation plus importante tout au long de la vie de la feuille. Dans ce cas, la plante privilégierait la remobilisation de formes minérales libres, ne nécessitant pas de protéolyse, par rapport à la remobilisation de formes complexées à des protéines, nécessitant une protéolyse associée à la sénescence foliaire. Pour certains éléments dont la remobilisation est fortement dépendante de la sénescence tel que l'azote, des travaux ont montré que le délai très court entre l'entrée en sénescence et la chute de la feuille (Malagoli *et al.*, 2005) mais également l'asynchronisme entre les besoins



**Figure VI.2:** Interactions élémentaires mises en évidence chez le colza soumis à différentes carences. Les secteurs colorés correspondent aux différentes carences : en Cu (vert), en Mg (bleu), en Zn (orange) ou en Fe (rouge, données non présentées dans le manuscrit de thèse). Chaque trait plein indique une augmentation significative relativement au témoin, de l'absorption de l'élément par la carence considérée. Les traits pointillés indiquent une réduction significative relativement au témoin, de l'absorption de l'élément par la carence considérée. Pour des raisons techniques, le Silicium (Si) n'a pas été mesuré au cours de ces expérimentations.

en azote des tissus en croissance et la période de remobilisation de l'azote (Rossato *et al.*, 2001) pouvaient être responsables de la mauvaise efficacité de remobilisation de l'azote observée chez le colza. L'existence d'une dissociation entre les deux mécanismes permettrait d'augmenter l'efficacité de remobilisation en étendant la durée de cette remobilisation à des stades antérieurs à la sénescence.

#### 4. Chez le colza, les carences en Cu, Mg et Zn induisent des modifications de l'absorption de nombreux éléments et du protéome foliaire

##### 4.1 Modifications de l'absorption des nutriments lors de carences en Zn, Mg et Cu.

Une analyse multi-élémentaire a été conduite sur les tissus de plantes carencées afin de déterminer si la carence en un élément unique (Cu, Zn, Mg) avait un impact sur les contenus élémentaires de ces tissus. La figure VI.2 fournit un bilan synthétique de l'absorption de chaque élément nutritif obtenue lors des 3 carences présentées, ainsi que les données obtenues avec une carence en Fe, non présentées dans ce manuscrit.

Les carences réalisées au cours de ce travail ont des répercussions sur de nombreux autres éléments (Figure VI.2) : une carence en Zn, augmente l'absorption de 6 éléments (Ca, Cu, Mn, Mo, N et P), celle en Mg, de 6 éléments (Zn, N, Mo, Mn, K et B), celle en Fe, de 5 éléments (Zn, Na, Mg, Cu et B), et enfin une carence en Cu augmente l'absorption du Zn, Mo, Mn, K et Ca. Cette vision bien que complexe, reste néanmoins partielle si on considère les données (déjà non exhaustives) de Baxter *et al.* (2008) présentées en introduction (Figure I.30). La multiplicité des régulations de l'absorption des éléments minéraux découlant de la diminution d'un seul d'entre eux soutient l'hypothèse que les interactions entre éléments doivent être sérieusement prises en compte pour tout projet de biofortification.

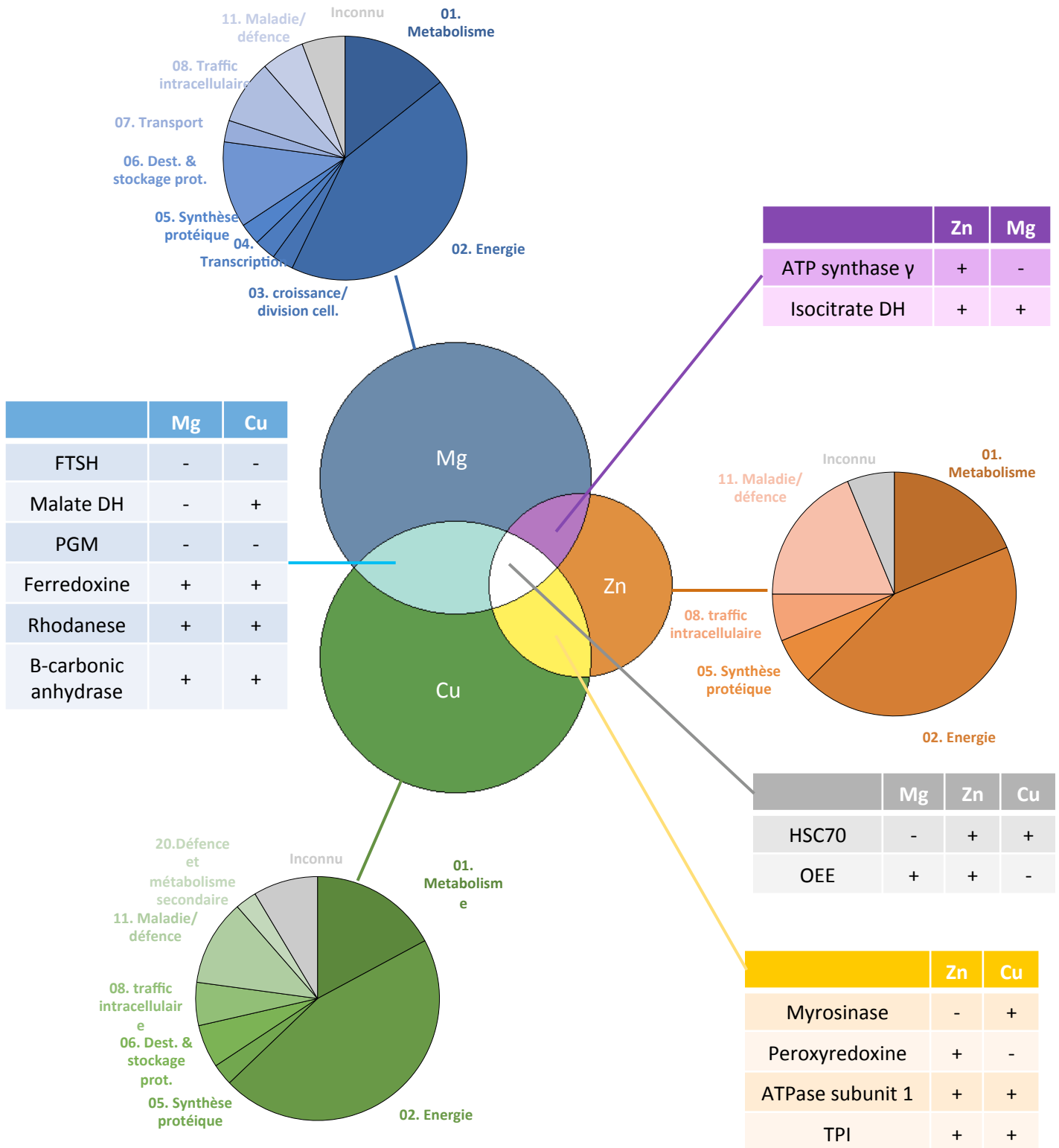
On peut noter que le contenu en Mg diminue dans les plantes carencées en Zn et Cu (variation de -27,0 % et -38,5 %, respectivement). L'absorption du Na diminue dans les trois carences, induisant une diminution de sa teneur dans les tissus. A notre connaissance, aucun argument permettant d'expliquer cette répression de l'absorption n'a été rapportée dans la bibliographie, si ce n'est le rôle osmotique des ions  $Mg^{2+}$  et  $Na^{+}$  (Marschner, 2012), qui pourraient réguler



l'homéostasie suite aux variations des teneurs d'autres cations tels que  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{2+}$ .

De manière très surprenante, le Mo est l'élément qui varie avec la plus forte intensité en réponse aux trois carences présentées dans ces travaux. Son absorption augmente ainsi d'environ 160%, 140% et 40% dans les plantes carencées en Cu, Zn et Mg, respectivement. Chez le colza, l'absorption du Mo est également accrue en réponse aux carences en N, K, S, P, Ca, Ni, Cl, Co ou Si (A. Maillard, communication personnelle). Selon les connaissances actuelles, le Mo n'est pourtant utilisé que dans 5 protéines chez les plantes : la nitrate réductase (NR, enzyme clé dans l'assimilation du nitrate), la sulfite oxydase (SO, qui détoxifie les sulfites), la xanthine déshydrogénase (XDH, impliquée dans la dégradation des purines), l'aldéhyde oxydase (AO, catalysant une étape de la synthèse d'auxine) et l'amidoxime réductase mitochondriale (mARC, qui aurait un rôle dans la détoxification dans la mitochondrie) (Mendel, 2013). Aucune d'entre elle n'utilise le Mo sous sa forme libre, mais sous une forme liée à une ptérine, dans un cofacteur appelée MoCo. Bien que ces cinq protéines contenant du MoCo soient cruciales pour la survie de la plante (notamment NR et AO), il est surprenant de voir que cet élément présent en si petite quantité ( $3,14 \pm 0,01 \text{ mg.plante}^{-1}$  dans les plantes témoins) puisse présenter des variations de +66,4% chez les plantes carencées en Zn et même de +163,9% dans les plantes carencées en Cu, et cela malgré une diminution de biomasse dans les deux cas (-18,4% pour les plantes carencées Cu et -31,0% pour Zn, Tableaux III.2 et V.1). L'explication de cette régulation provient peut-être de la protéine CNX1, qui catalyse la réaction d'insertion du Mo dans le précurseur MoCo. en effet, l'activité de CNX1 serait régulée par la concentration en Zn (Llamas *et al.*, 2006), et cette réaction implique un atome de Cu en tant que cofacteur. (Mendel, 2013). De plus, CNX1 régulerait également la concentration intracellulaire de Mo (Tejada-Jiménez *et al.*, 2009) (voir discussion du chapitre III et Figure III.6 pour plus de détails)

Lors d'une carence en Mg chez les végétaux, il a été rapporté que le  $\text{Mg}^{2+}$  pourrait être remplacé par un ion  $\text{Mn}^{2+}$  au sein d'enzymes Mg-dépendantes (Tari *et al.*, 1997), mais en conduisant à une activité réduite (Lovitt *et al.*, 2010). Ceci expliquerait l'augmentation de l'absorption du Mn observée dans les plantes carencées en Mg, afin de compenser en partie la diminution d'environ 50% du Mg



**Figure VI.3:** Réponses du colza à l'échelle protéomique à une carence en Mg, Zn ou Cu des feuilles âgées du colza: Le diagramme de Venn (au centre) représente le nombre de protéines différentes différentiellement exprimées (nombre proportionnel à l'aire) dans les carences en Cu (vert), en Mg (bleu) ou en Zn (orange). Les diagrammes circulaires représentent les principales fonctions affectées pour chaque carence. Les tableaux regroupent les protéines identiques entre les traitements. Les signes + et - indiquent respectivement une augmentation et une diminution de la quantité de la protéine en réponse à la carence, relativement au témoin non carencé.

intracellulaire. De manière intéressante, cette augmentation de l'absorption du Mn est liée à une augmentation de l'OEE, responsable de la photolyse de l'eau au sein du photosystème II et une des principales enzymes à Mn chez les végétaux. Cette même observation a été réalisée dans les plantes carencées en Zn, ce qui établit un lien entre la perturbation de la teneur en Mn par une carence et l'expression d'OEE, laissant sous-entendre toute l'importance de la cascade de modifications suivant tout changement dans la nutrition minérale de la plante.

Le Mn est d'autant plus intéressant qu'il est également accumulé dans les plantes soumises aux trois carences présentées (Mg, Cu et Zn), ainsi qu'en réponse à d'autres carences en K, S et B (A. Maillard, communication personnelle), mais également dans les plantes traitées par les biostimulants AZAL5 et HA7 (Figure VI.1 et VI.2). Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que l'augmentation de Mn dans les plantes traitées par AZAL5 et HA7 découlerait de leurs effets bénéfiques sur l'absorption (ou la translocation) de Cu, Mg ou Zn.

Le Zn ressort également de nos analyses comme un nutriment dont la régulation est fortement liée aux autres nutriments, que ce soit lors d'une privation en Zn, ou au contraire lors d'une privation en Mg, Cu ou Fe (Figure VI.2). Le Zn est un élément structural de nombreux facteurs de transcription (protéines à doigt de Zn) régulant une multitude de voies métaboliques dont celles de réponse aux stress, pouvant ainsi expliquer sa forte réactivité à de nombreuses carences.

#### 4.2 Modifications du protéome des feuilles âgées des plantes carencées

Il faut considérer que les approches protéomiques précédemment rapportées restent très partielles. D'une part, seules les protéines solubles les plus fortement accumulées peuvent être visualisées et potentiellement identifiées et d'autre part, cette approche n'a été réalisée qu'avec des échantillons foliaires de plantes soumises à 25 jours de carence. En l'absence de cinétique, d'éventuelles cascades de régulations ne peuvent être appréhendées. Il en résulte globalement que cette approche, n'a pas permis d'accéder à des mécanismes spécifiquement impliqués dans les processus de remobilisation.

Si des réponses communes aux trois types de carence n'étaient *à priori* pas attendues comme l'illustre la Figure VI.3, on peut toutefois considérer qu'une carence, conduit généralement à augmenter l'expression de protéines requérant





l'élément en question, ou bien celle de protéines enzymatiques situées en amont de la voie métabolique concernée. C'est par exemple, ce que nous avons pu observer avec une carence en Cu durant laquelle la PhosphoGlucoKinase, Cu-dépendante est sur-exprimée, ainsi que des enzymes impliquées en amont de cette étape telles les transketolases ou l'aldolase (Figure III.5). Une telle cascade supposerait une réduction d'un feed back négatif par un produit de réaction, présent en plus faible quantité suite à la carence.

De façon complémentaire, lors d'une carence en Mg, le remplacement de cet élément par du Mn au sein de certaines enzymes Mg-dépendantes, tel que suggéré par la littérature (Tari *et al.*, 1997) conduirait à une activité catalytique réduite et par contre coup, à une surexpression de la protéine. C'est par exemple ce qui peut être suggéré pour l'Isocitrate Déshydrogénase, protéine induite dans les feuilles de colza en réponse à la carence en Mg (Tableau IV.2).

D'autres similarités plus globales (Figure VI.3) sont cependant à noter dans les fonctions cellulaires (telles que définies par Bevan *et al.* (1998)) affectées par ces trois carences. Ainsi, les protéines impliquées dans des mécanismes liés à l'énergie (voies métaboliques de la glycolyse, de la photosynthèse et de la respiration, majoritairement), représentent dans les trois cas environ 45% des protéines affectées. De même, la catégorie « métabolisme » regroupe environ 15% des protéines sur- ou sous-exprimées.

Dans le cas d'une carence Zn et en Mg (Figure VI.3), les protéines cytosoliques sont les plus affectées (7 protéines sur les 17 identifiées et 15 sur 38, respectivement) alors que la carence en Cu perturbe majoritairement le protéome du chloroplaste (17 protéines sur 33). Le protéome du chloroplaste est également fortement perturbé en réponse à une carence en Mg, avec 11 protéines sur 38 localisées dans le chloroplaste dans notre étude. Cette observation peut s'expliquer par le fait que de nombreuses protéines Cu- ou Mg-dépendantes sont localisée dans cet organelle. Il n'y a donc pas non plus de consensus dans les compartiments cellulaires majoritairement impactés par ces carences.



## CHAPITRE 7 : Perspectives

---

Deux axes de recherches ont été abordés dans une optique de biostimulation des plantes visant à augmenter leur contenu en Fe, Mg, Zn et Cu, à savoir l'utilisation de biostimulants et la possibilité d'utiliser le mécanisme de remobilisation pour une potentielle sélection variétale. Dans un cas comme dans l'autre, des expérimentations complémentaires doivent être menées afin d'une part, de valider les effets biofortifiants d'AZAL5 et HA7 et d'étendre leur potentiel d'utilisation, et d'autre part, de poursuivre le décryptage des mécanismes de remobilisation. L'exploration de ces deux axes soulève également des questions annexes, notamment sur les rôles du Mo et du Mn dans les interactions ionomiques en vue d'une éventuelle application. De façon non exhaustive et non hiérarchisée, les différentes perspectives de recherche découlant de ce travail sont les suivantes :

- 1) Avant de pouvoir parvenir à une utilisation en plein champ et à grande échelle des biostimulants décrits dans le chapitre II, il paraît nécessaire de vérifier que les observations des effets positifs des biostimulants AZAL5 et HA7 sur l'absorption de Cu et Mg, et la translocation de Fe et Zn, réalisées au cours du stade végétatif du colza, interviennent aussi lors du développement reproducteur afin de vérifier si le remplissage des grains en micronutriments est positivement impacté par ces extraits.
- 2) Dans nos expérimentations, les plantes ont été cultivées en conditions d'alimentation minérale pléthoriques. Il importerait donc de quantifier l'impact de ces biostimulants en conditions de disponibilités fluctuantes en un ou plusieurs minéraux (plein champ ou hydroponie). On peut en effet émettre l'hypothèse que la stimulation de la croissance racinaire par ces 2 extraits couplée à une augmentation de l'activité de certains transporteurs devrait être favorable lorsque la plante est confrontée à une hétérogénéité spatiale et temporelle de la teneur en éléments minéraux du sol.
- 3) Parallèlement, le sol joue un rôle important dans la stabilité et l'efficacité des biostimulants. En réalisant des expérimentations en conditions contrôlées et en hydroponie, nous nous sommes affranchi de ces paramètres. Des essais en plein



champ sont donc à prévoir afin de quantifier le pouvoir biostimulant de ces extraits en conditions réelles de culture. Plus spécifiquement, il serait intéressant de vérifier si les macromolécules organiques du sol ne séquestrent pas certains composants éliciteurs de ces extraits, ou que la microflore ne dégrade pas ces mêmes composants, rendant ces biostimulants inefficaces. Alternativement, des apports foliaires pourraient aussi être envisagés.

- 4) L'amélioration du contenu en nutriments par ces deux biostimulants, ouvre également la voie à l'identification de nouveaux biostimulants, *via* de nouvelles procédures de screening, qui pourraient eux aussi avoir un effet biofortifiant sans apport supplémentaire de fertilisants, dans des proportions qui pourraient être plus importantes que celles décrites dans cette étude. Enfin, dans un contexte de biofortification, l'utilisation d'autres espèces, en particulier des céréales, devrait également être envisagée.
- 5) En ce qui concerne le volet plus fondamental de ces travaux, et en particulier les liens entre sénescence foliaire et remobilisation (de Mg ou de Cu) pourraient être précisés, notamment en utilisant l'indicateur moléculaire *SAG12-Cab* (Gombert *et al.*, 2006) qui permet, chez le colza, de déterminer précisément la date d'entrée en sénescence de la feuille. Ainsi, une date d'entrée en sénescence foliaire postérieure à la période de mobilisation massive de Cu et Mg confirmerait que les processus de mobilisation de ces deux éléments sont indépendants de la sénescence. Si tel était le cas, il serait alors possible de se focaliser sur les mécanismes requis pour cette remobilisation. Par exemple, on peut émettre l'hypothèse que la remobilisation du Mg se fait essentiellement à partir du  $Mg^{2+}$  libre, comme le suggèrent nos résultats, ce qui expliquerait que ce mécanisme soit indépendant de la sénescence et donc de la protéolyse associée. Dans ce cas, il deviendrait pertinent de se focaliser sur les transporteurs impliqués dans l'efflux de  $Mg^{2+}$  de la vacuole, ainsi que sur les mécanismes de transport à longue distance tels que le chargement et le déchargement du phloème.
- 6) L'approche expérimentale que nous avons mise en place visait à estimer la remobilisation nette de chaque élément considéré, et pour cela à se placer en condition de carence totale. Si les résultats obtenus sont particulièrement clairs pour le Mg et le Cu, il n'en est pas de même pour le Zn et le Fe pour lesquelles



des traces significatives subsistaient dans la solution nutritive. Il importerait donc de confirmer l'absence de remobilisation foliaire de ces deux éléments en utilisant des marquages isotopiques pouvant être conduits en interne pour le Zn (mesure des ratios isotopiques du Zn par ICP-MS Haute Résolution), ou en collaboration pour le Fe dont l'analyse des ratios isotopiques nécessite des équipements plus performants (ICP-MS multi-collecteurs). Enfin, l'absence de remobilisation de ces 2 éléments, si elle est confirmée, pourrait être due soit à une séquestration vacuolaire par exemple, car potentiellement toxiques, des produits de dégradation contenant du Fe ou du Zn, ou alternativement à une absence de transport phloémique. Ce dernier cas, permettrait peut-être d'expliquer les différences de comportement entre espèces pour le Zn, non remobilisé chez le colza alors qu'il l'est chez le blé selon certains auteurs.

Les analyses ionomiques que nous avons utilisées pour ce travail permettent l'obtention des résultats particulièrement riches mais complexes comme l'illustrent les interactions multiples que nous avons pu mettre en évidence pour seulement quatre types de carences.

- 7) La première perspective consisterait donc à étendre ce travail aux 14 éléments minéraux indispensables à la croissance des végétaux et peut être à ceux qui présentent un effet positif sur leur fonctionnement (Si, Na, Co, Se par exemple). La première partie de ce travail est d'ailleurs en cours dans le cadre de la thèse d'Anne Maillard.
- 8) Nous avons montré qu'une carence d'un élément nutritif (Cu, Mg, Zn, ou Fe) améliore l'absorption d'autres éléments minéraux. Il importerait de vérifier l'effet inverse, notamment lorsqu'un élément est accumulé à un niveau potentiellement plus élevé. Cela pourrait avoir des effets importants par exemple lors de l'utilisation d'un biostimulant tels que ceux que nous avons utilisés.
- 9) Deux éléments, Mn et Mo, apparaissent comme particulièrement réactifs lors d'une situation de carence. Le Mo et le Mn sont plus largement absorbés lors d'une carence en Cu, en Mg ou en Zn. L'absorption du Mo est par ailleurs fortement stimulée dans d'autres situations de carences par exemple en S, en B ou en Mn (A. Maillard, communication personnelle). Nos travaux sur le Cu, suggèrent que cette stimulation de l'absorption du Mo pourrait être due à une





réduction de la synthèse du cofacteur Mo, qui requière du Cu. Cette hypothèse pourrait être étendue aux autres éléments requis pour la synthèse du MoCo, et validée en ciblant certaines étapes de sa synthèse. Par exemple, l'expression de CNX1 (expression du gène, activité de l'enzyme) de même que la quantification de certains intermédiaires de la synthèse du MoCo pourraient permettre de comprendre cette interaction.

- 10) L'absorption du Mn est également fortement stimulée par les carences en Cu, en Zn ou en Mg, mais aussi par l'apport des biostimulants AZAL5 et HA7. De plus, les modifications de la teneur en Mn sont accompagnées d'une modulation de la quantité de la protéine OEE (protéine du photosystème I, contenant du Mn) dans les trois analyses protéomiques réalisées au cours des expérimentations de carence. Cette protéine dont l'activité est dépendante du Mn est au centre du mécanisme de photosynthèse. Les variations de Mn sont donc également à prendre en considération lors de projet de biofortification. Par ailleurs, le Mn constitue aussi un élément minéral dont les modalités de régulation de l'absorption restent à éclaircir en cas de modification du ionome.
- 11) Les analyses ionomiques et protéomiques que nous avons réalisées intervenaient après 25 jours de carence, ce qui ne permet pas d'accéder aux cascades de régulations impliquées, ni à leur dynamique. De façon ciblée, des analyses cinétiques permettraient d'y accéder et pourraient être associées à la quantification des certains métabolites clés. Ces approches permettraient de préciser les régulations impliquées et de comprendre certaines observations. Par exemple, la protéine OEE dont l'activité est Mn dépendante est surexprimée dans le cadre de carence en Mg ou en Zn et sous exprimée lors d'une carence en Cu. Pourtant, ces 3 carences augmentent l'absorption du Mn.
- 12) Une meilleure compréhension des interactions à l'échelle ionomique constitue un préalable indispensable à l'application potentielle de ces connaissances. Ces dernières pourraient notamment permettre la mise au point d'outils permettant de diagnostiquer, le plus précocement possible (avant que les symptômes n'apparaissent), les déficiences en Zn, Mg, Cu et Fe. Ce type de stratégie est actuellement abordé pour prévenir la carence en S dans le cadre du projet SERAPIS, impliquant l'UMR EVA et Timac Agro International. Cette stratégie



pourrait être élargie à d'autres éléments nutritifs afin de prévenir de façon précoce, des carences nutritionnelles et donc éviter des pertes de rendements ou de qualité des produits récoltés.



## Bibliographie

---

### A

- Abdallah, M., Dubousset, L., Meuriot, F., Etienne, P., Avice, J.-C., Ourry, A.,** 2010. Effect of mineral sulphur availability on nitrogen and sulphur uptake and remobilization during the vegetative growth of *Brassica napus* L. *J. Exp. Bot.* **61**, 2635–2646.
- Abreu, I.A., Cabelli, D.E.,** 2010. Superoxide dismutases—a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1804**, 263–274.
- Aguirre, E., Elena, A., Leménager, D., Diane, L., Bacaicoa, E., Eva, B., Fuentes, M., Marta, F., Baigorri, R., Roberto, B., Zamarreño, A.M., García-Mina, J.M.,** 2009. The root application of a purified leonardite humic acid modifies the transcriptional regulation of the main physiological root responses to Fe deficiency in Fe-sufficient cucumber plants. *Plant Physiol. Biochem.* **47**, 215–223.
- Alexandratos, N., Bruinsma, J., others,** 2012. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. ESA Working paper Rome, FAO.
- Allen, L., World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations,** 2006. Guidelines on food fortification with micronutrients. World Health Organization; Food and Agriculture Organization of the United Nations, Geneva; Rome.
- Alloway, B.J.,** 1976. Field studies on the magnesium, copper and zinc nutrition of maize. *J. Agric. Sci.* **86**, 93–101.
- Alloway, B.J.,** 2004. Zinc in soils and crop nutrition. International Zinc Association publication, Brussels, Belgium.
- Alloway, B.J.,** 2013. Bioavailability of Elements in Soil, in: Selinus, O. (Ed.), *Essentials of Medical Geology*. Springer Netherlands, pp. 351–373.
- Amtmann, A., Armengaud, P.,** 2009. Effects of N, P, K and S on metabolism: new knowledge gained from multi-level analysis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 275–283.
- Andersen, P.,** 2007. A review of micronutrient problems in the cultivated soil of Nepal. *Mt. Res. Dev.* **27**, 331–335.
- Andreini, C., Bertini, I., Rosato, A.,** 2009. Metalloproteomes: a bioinformatic approach. *Acc. Chem. Res.* **42**, 1471–1479.



- Andrés-Colás, N., Perea-García, A., de Andrés, S.M., Garcia-Molina, A., Dorcey, E., Rodríguez-Navarro, S., Pérez-Amador, M.A., Puig, S., Peñarrubia, L., 2013.** Comparison of global responses to mild deficiency and excess copper levels in Arabidopsis seedlings. *Metallomics* **5**, 1234–1246.
- Arancon, N.Q., Edwards, C.A., Bierman, P., Metzger, J.D., Lucht, C., 2005.** Effects of vermicomposts produced from cattle manure, food waste and paper waste on the growth and yield of peppers in the field. *Pedobiologia* **49**, 297–306.
- Avicé, J.-C., Etienne, P., 2014.** Leaf senescence and Nitrogen Remobilization Efficiency in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J. Exp. Bot.* in press. doi:JEXBOT/2014/119172, IF: 5,54.

## B

- Bailey, E., Stirpe, F., Taylor, C.B., 1968.** Regulation of rat liver pyruvate kinase. The effect of preincubation, pH, copper ions, fructose 1,6-diphosphate and dietary changes on enzyme activity. *Biochem. J.* **108**, 427–436.
- Barona, E., Ramankutty, N., Hyman, G., Coomes, O.T., 2010.** The role of pasture and soybean in deforestation of the Brazilian Amazon. *Environ. Res. Lett.* **5**, 024002.
- Barratt, D.G., Cook, R.A., 1978.** Role of metal cofactors in enzyme regulation. Differences in the regulatory properties of the *Neurospora crassa* nicotinamide adenine dinucleotide specific isocitrate dehydrogenase depending on whether Mg<sup>2+</sup> or Mn<sup>2+</sup> serves as divalent cation. *Biochemistry* **17**, 1561–1566.
- Basak, A., Mandal, L.N., Haldar, M., 1982.** Interaction of phosphorus and molybdenum in relation to uptake and utilization of molybdenum, phosphorus, zinc, copper and manganese by rice. *Plant Soil* **68**, 261–269.
- Baszyński, T., Warchołowa, M., Krupa, Z., Tukendorf, A., Król, M., Wolińska, D., 1980.** The effect of magnesium deficiency on photochemical activities of rape and buckwheat chloroplasts. *Z. Für Pflanzenphysiol.* **99**, 295–303.
- Baxter, I., 2009.** Ionomics: studying the social network of mineral nutrients. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 381–386.
- Baxter, I.R., Vitek, O., Lahner, B., Muthukumar, B., Borghi, M., Morrissey, J., Gueriot, M.L., Salt, D.E., 2008.** The leaf ionome as a multivariable system to detect a plant's physiological status. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 12081–12086.
- Beckett, R.P., Van Staden, J., 1989.** The effect of seaweed concentrate on the growth and yield of potassium stressed wheat. *Plant Soil* **116**, 29–36.





- Bernal, M., Casero, D., Singh, V., Wilson, G.T., Grande, A., Yang, H., Dodani, S.C., Pellegrini, M., Huijser, P., Connolly, E.L., others, 2012.** Transcriptome sequencing identifies SPL7-regulated copper acquisition genes FRO4/FRO5 and the copper dependence of iron homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Online* **24**, 738–761.
- Bertini, D.I., Pierattelli, D.R., 2013.** Plastocyanin, in: Kretsinger, R.H., Uversky, V.N., Permyakov, E.A. (Eds.), *Encyclopedia of Metalloproteins*. Springer New York, pp. 1694–1698.
- Bevan, M., Bancroft, I., Bent, E., Love, K., Goodman, H., et al., 1998.** Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **391**, 485–488.
- Bhutta, Z.A., Black, R.E., Brown, K.H., Gardner, J.M., Gore, S., Hidayat, A., Khatun, F., Martorell, R., Ninh, N.X., Penny, M.E., others, 1999.** Prevention of diarrhea and pneumonia by zinc supplementation in children in developing countries: pooled analysis of randomized controlled trials. *J. Pediatr.* **135**, 689–697.
- Billman, G.L., 1986.** The effects of zinc on chitinase activity: an honors thesis ([HONRS] 499). Virtual Press.
- Binet, C., 2009.** Métabolisme du Fer : apports, absorption, transport, réserves, méthodes d'exploration. Hématologie Fac. Médecine Tours.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J., 1987.** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93–99.
- Blunden, G., Jenkins, T., Liu, Y.-W., 1996.** Enhanced leaf chlorophyll levels in plants treated with seaweed extract. *J. Appl. Phycol.* **8**, 535–543.
- Bouis, H.E., 2000.** Improving human nutrition through agriculture: The role of international agricultural research. Conference summary and recommendations. *Food Nutr. Bull.* **21**, 550–567.
- Bouis, I., 2012.** Biofortification: Leveraging agriculture to reduce hidden hunger. Ed. Shenggen Fan Rajul Pandya-Lorch 83.
- Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Bradová, J., Matějová, E., 2008.** Comparison of the results of SDS PAGE and chip electrophoresis of wheat storage proteins. *Chromatographia* **67**, 83–88.
- Briat, J.-F., Vert, G., 2004.** Acquisition et gestion du fer par les plantes. *Cah. Agric.* **13**, 183–201.
- Broadley, M., Brown, P., Cakmak, I., Rengel, Z., Zhao, F., 2012.** Chapter 7 - Function of Nutrients: Micronutrients, in: Marschner, P. (Ed.), *Marschner's*



Mineral Nutrition of Higher Plants (Third Edition). Academic Press, San Diego, pp. 191–248.

**Broadley, M.R., White, P.J., Hammond, J.P., Zelko, I., Lux, A., 2007.** Zinc in plants. *New Phytol.* **173**, 677–702.

**Brown, K.H., Wuehler, S.E., Peerson, J.M., 2001.** The importance of zinc in human nutrition and estimation of the global prevalence of zinc deficiency. *Food Nutr. Bull.* **22**, 113–125.

**Buchanan-Wollaston, V., 1997.** The molecular biology of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* **48**, 181–199.

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

**Burda, K., Kruk, J., Schmid, G.H., Strzalka, K., 2003.** Inhibition of oxygen evolution in Photosystem II by Cu(II) ions is associated with oxidation of cytochrome b559. *Biochem. J.* **371**, 597–601.

## C

**Cakmak, I., 2008.** Zinc Deficiency in Wheat in Turkey, in: Alloway, B.J. (Ed.), *Micronutrient Deficiencies in Global Crop Production*. Springer Netherlands, pp. 181–200.

**Cakmak, I., Hengeler, C., Marschner, H., 1994a.** Partitioning of shoot and root dry matter and carbohydrates in bean plants suffering from phosphorus, potassium and magnesium deficiency. *J. Exp. Bot.* **45**, 1245–1250.

**Cakmak, I., Hengeler, C., Marschner, H., 1994b.** Changes in phloem export of sucrose in leaves in response to phosphorus, potassium and magnesium deficiency in bean plants. *J. Exp. Bot.* **45**, 1251–1257.

**Cakmak, I., Marschner, H., 1992.** Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol.* **98**, 1222–1227.

**Cakmak, I., Yazici, A.M., 2010.** Magnesium: a forgotten element in crop production. *Better Crops* **94**, 23–25.

**Cambell, N.A., Reece, J.B., 2006.** *Biologie*. De Boeck Université, Louvain, Belgique

**Cao, X.-Y., Jiang, X.-M., Dou, Z.-H., Rakeman, M.A., Zhang, M.-L., O'Donnell, K., Ma, T., Amette, K., DeLong, N., DeLong, G.R., 1994.** Timing of vulnerability of the brain to iodine deficiency in endemic cretinism. *N. Engl. J. Med.* **331**, 1739–1744.



- Castruita, M., Casero, D., Karpowicz, S.J., Kropat, J., Vieler, A., Hsieh, S.I., Yan, W., Cokus, S., Loo, J.A., Benning, C., Pellegrini, M., Merchant, S.S., 2011.** Systems biology approach in *Chlamydomonas* reveals connections between copper nutrition and multiple metabolic steps. *Plant Cell Online* **23**, 1273–1292.
- Caulfield, L.E., Richard, S.A., Black, R.E., 2004.** Undernutrition as an underlying cause of malaria morbidity and mortality in children less than five years old. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **71**, 55–63.
- Cereda, A., Carpen, A., Picariello, G., Tedeschi, G., Pagani, S., 2009.** The lack of rhodanese RhdA affects the sensitivity of *Azotobacter vinelandii* to oxidative events. *Biochem. J.* **418**, 135.
- Chalhoub, B., Denoeud, F., Liu, S., Parkin, I.A.P., Tang, H., et al., 2014.** Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science* **345**, 950–953. doi:10.1126/science.1253435
- Chang, X., Jørgensen, A.M.M., Bardrum, P., Led, J.J., 1997.** Solution structures of the R6 human insulin hexamer. *Biochemistry (Mosc.)* **36**, 9409–9422.
- Chavez, A.L., Bedoya, J.M., Sánchez, T., Iglesias, C., Ceballos, H., Roca, W., 2000.** Iron, carotene, and ascorbic acid in cassava roots and leaves. *Food Nutr. Bull.* **21**, 410–413.
- Chen, J., Li, L., Liu, Z., Yuan, Y., Guo, L., Mao, D., Tian, L., Chen, L., Luan, S., Li, D., 2009.** Magnesium transporter AtMGT9 is essential for pollen development in *Arabidopsis*. *Cell Res.* **19**, 887–898.
- Chillappagari, S., Seubert, A., Trip, H., Kuipers, O.P., Marahiel, M.A., Miethke, M., 2010.** Copper stress affects iron homeostasis by destabilizing iron-sulfur cluster formation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **192**, 2512–2524.
- Cogswell, M.E., Looker, A.C., Pfeiffer, C.M., Cook, J.D., Lacher, D.A., Beard, J.L., Lynch, S.R., Grummer-Strawn, L.M., 2009.** Assessment of iron deficiency in US preschool children and nonpregnant females of childbearing age: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2006. *Am. J. Clin. Nutr.* **89**, 1334–1342.
- Collins, J.F., Klevay, L.M., 2011.** Copper. *Adv. Nutr.* **2**, 520–522.
- Conn, S.J., Conn, V., Tyerman, S.D., Kaiser, B.N., Leigh, R.A., Gilliham, M., 2011.** Magnesium transporters, MGT2/MRS2-1 and MGT3/MRS2-5, are important for magnesium partitioning within *Arabidopsis thaliana* mesophyll vacuoles. *New Phytol.* **190**, 583–594.
- Cowan, J.A., 2002.** Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes. *Biometals* **15**, 225–235.



**Crouch, I.J., Van Staden, J.,** 1992. Effect of seaweed concentrate on the establishment and yield of greenhouse tomato plants. *J. Appl. Phycol.* **4**, 291–296.

## D

**Del Pozo, T., Cambiazo, V., González, M.,** 2010. Gene expression profiling analysis of copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **393**, 248–252.

**Deng, F., Yamaji, N., Xia, J., Ma, J.F.,** 2013. A member of the heavy metal P-type ATPase OshMA5 is involved in xylem loading of copper in rice. *Plant Physiol.* **163**, 1353–1362.

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

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

**De Vilmorin, L.L.,** 1886. Notices sur l'amélioration des plantes par le semis considérations sur l'hérédité dans les végétaux: Précédés d'un mémoire sur l'amélioration de la carotte sauvage. Vilmorin-Andrieux et cie.

**D'Hooghe, P., Escamez, S., Trouverie, J., Avice, J.-C.,** 2013. Sulphur limitation provokes physiological and leaf proteome changes in oilseed rape that lead to perturbation of sulphur, carbon and oxidative metabolisms. *BMC Plant Biol.* **13**, 23.

**Dixon, J.B., Schulze, D.G., Johnston, C.T., Tombacz, E.,** 2002. Surface Chemistry of Soil Minerals, in: SSSA Book Series. Soil Science Society of America.

**Draycott, P., Allison, M.,** 1998. Magnesium fertilisers in soil and plants: comparisons and usage. Proc.-Fertil. Soc. U. K.

**Drummond, R.S.M., Tutone, A., Li, Y.-C., Gardner, R.C.,** 2006. A putative magnesium transporter AtMRS2-11 is localized to the plant chloroplast envelope membrane system. *Plant Sci.* **170**, 78–89.

**Dubousset, L., Etienne, P., Avice, J.C.,** 2010. Is the remobilization of S and N reserves for seed filling of winter oilseed rape modulated by sulphate restrictions occurring at different growth stages? *J. Exp. Bot.* **61**, 4313–4324.





## E

- Erenoglu, E.B., Kutman, U.B., Ceylan, Y., Yildiz, B., Cakmak, I.**, 2011. Improved nitrogen nutrition enhances root uptake, root-to-shoot translocation and remobilization of zinc ( $^{65}\text{Zn}$ ) in wheat. *New Phytol.* **189**, 438–448.
- Etienne, P., Desclos, M., Le Gou, L., Gombert, J., Bonnefoy, J., Maurel, K., Le Dily, F., Ourry, A., Avice, J.-C.**, 2007. N-protein mobilisation associated with the leaf senescence process in oilseed rape is concomitant with the disappearance of trypsin inhibitor activity. *Funct Plant Biol* **34**, 895–906.
- Eyheraguibel, B., Silvestre, J., Morard, P.**, 2008. Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. *Bioresour. Technol.* **99**, 4206–4212.

## F

- Fan, M.-S., Zhao, F.-J., Fairweather-Tait, S.J., Poulton, P.R., Dunham, S.J., McGrath, S.P.**, 2008. Evidence of decreasing mineral density in wheat grain over the last 160 years. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **22**, 315–324.
- FAO**, 2013. Fao statistical yearbook 2013. Food & Agriculture Organi.
- Faure-Rabasse, S., Deunff, E.L., Lainé, P., Macduff, J.H., Ourry, A.**, 2002. Effects of nitrate pulses on *BnNRT1* and *BnNRT2* genes: mRNA levels and nitrate influx rates in relation to the duration of N deprivation in *Brassica napus* L. *J. Exp. Bot.* **53**, 1711–1721.
- Fernandez, V., Sotiropoulos, T., Brown, P.**, 2013. Foliar fertilization: scientific principles and field practices, First Edition. ed. International Fertilizer Industry Association (IFA).
- Fink, S., Tabingen, U.**, 1992. Physiologische und strukturelle Veränderungen an Bäumen unter Magnesiummangel. *MARSCHNER P Miner. Nutr. High. Plants* **3**.
- Fukao, Y., Ferjani, A., Fujiwara, M., Nishimori, Y., Ohtsu, I.**, 2009. Identification of zinc-responsive proteins in the roots of *Arabidopsis thaliana* using a highly improved method of two-dimensional electrophoresis. *Plant Cell Physiol.* **50**, 2234–2239.

## G

- Garcia-Mina, J.M.**, 2006. Stability, solubility and maximum metal binding capacity in metal–humic complexes involving humic substances extracted from peat and organic compost. *Org. Geochem., Advances in Organic Geochemistry*



2005 Proceedings of the 22<sup>nd</sup> International Meeting on Organic Geochemistry, Seville, Spain, 12-16 September 2005 37, 1960–1972.

- Garcia-Molina, A., Andrés-Colás, N., Perea-García, A., Neumann, U., Dodani, S.C., Huijser, P., Peñarrubia, L., Puig, S.,** 2013. The Arabidopsis COPT6 transport protein functions in copper distribution under copper-deficient conditions. *Plant Cell Physiol.* **54**, 1378–1390.
- Garvin, D.F., Welch, R.M., Finley, J.W.,** 2006. Historical shifts in the seed mineral micronutrient concentration of US hard red winter wheat germplasm. *J. Sci. Food Agric.* **86**, 2213–2220.
- Gebert, M., Meschenmoser, K., Svidova, S., Weghuber, J., Schweyen, R., Eifler, K., Lenz, H., Weyand, K., Knoop, V.,** 2009. A root-expressed magnesium transporter of the MRS2/MGT gene family in *Arabidopsis thaliana* allows for growth in low-Mg<sup>2+</sup> environments. *Plant Cell* **21**, 4018–4030.
- Genc, Y., McDonald, G.K., Graham, R.D.,** 2000. Effect of seed zinc content on early growth of barley (*Hordeum vulgare* L.) under low and adequate soil zinc supply. *Aust. J. Agric. Res.* **51**, 37–46.
- Gerland, P., Raftery, A.E., Ševčíková, H., Li, N., Gu, D., Spoorenberg, T., Alkema, L., Fosdick, B.K., Chunn, J., Lalic, N., Bay, G., Buettner, T., Heilig, G.K., Wilmoth, J.,** 2014. World population stabilization unlikely this century. *Science*. doi:10.1126/science.1257469
- Giulia, M., Caricato, R., Elena, M., Erroi, E., Schettino, T.,** 2012. Carbonic Anhydrase and Heavy Metals, in: Ekinci, D. (Ed.), Biochemistry. InTech.
- Gladyshev, V.N., Kryukov, G.V., Fomenko, D.E., Hatfield, D.L.,** 2004. Identification of trace element-containing proteins in genomic databases. *Annu Rev Nutr* **24**, 579–596.
- Gojon, A., Nacry, P., Davidian, J.-C.,** 2009. Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 328–338.
- Gombert, J., Etienne, P., Ourry, A., Le Dily, F.,** 2006. The expression patterns of SAG12/Cab genes reveal the spatial and temporal progression of leaf senescence in *Brassica napus* L. with sensitivity to the environment. *J. Exp. Bot.* **57**, 1949–1956.
- Graham, R.D., Nambiar, E.S.,** 1981. Advances in research on copper deficiency in cereals. *Aust. J. Agric. Res.*
- Grusak, M.A., Cakmak, I.,** 2005. 12 Methods to improve the crop-delivery of minerals to humans and livestock. *Plant Nutr. Genomics* **265**.
- Guerinot, M.L., Salt, D.E.,** 2001. Fortified foods and phytoremediation. Two sides of the same coin. *Plant Physiol.* **125**, 164–167.



## H

- Hacisalihoglu, G., Kochian, L.V.**, 2003. How do some plants tolerate low levels of soil zinc? Mechanisms of zinc efficiency in crop plants. *New Phytol.* **159**, 341–350.
- Halfdanarson, T.R., Kumar, N., Li, C.-Y., Phyliky, R.L., Hogan, W.J.**, 2008. Hematological manifestations of copper deficiency: a retrospective review. *Eur. J. Haematol.* **80**, 523–531.
- Hambidge, M.**, 2000. Human zinc deficiency. *J. Nutr.* **130**, 1344S–1349S.
- Hänsch, R., Mendel, R.R.**, 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 259–266.
- Hattori, M., Tanaka, Y., Fukai, S., Ishitani, R., Nureki, O.**, 2007. Crystal structure of the MgtE Mg<sup>2+</sup> transporter. *Nature* **448**, 1072–1075.
- Heide, H., Kalisz, H.M., Follmann, H.**, 2004. The oxygen evolving enhancer protein 1 (OEE) of photosystem II in green algae exhibits thioredoxin activity. *J. Plant Physiol.* **161**, 139–149.
- Hell, R., Stephan, U.W.**, 2003. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* **216**, 541–551.
- Hennig, M., Grimm, B., Contestabile, R., John, R.A., Jansonius, J.N.**, 1997. Crystal structure of glutamate-1-semialdehyde aminomutase: an alpha2-dimeric vitamin B6-dependent enzyme with asymmetry in structure and active site reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4866–4871.
- Hermans, C., Conn, S.J., Chen, J., Xiao, Q., Verbruggen, N.**, 2013. An update on magnesium homeostasis mechanisms in plants. *Metallomics* **5**, 1170.
- Hermans, C., Verbruggen, N.**, 2005. Physiological characterization of Mg deficiency in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **56**, 2153–2161.
- Hermans, C., Vuylsteke, M., Coppens, F., Cristescu, S.M., Harren, F.J.M., Inzé, D., Verbruggen, N.**, 2010. Systems analysis of the responses to long-term magnesium deficiency and restoration in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* **187**, 132–144.
- Higashi, Y., Takechi, K., Takano, H., Takio, S.**, 2013. Involvement of microRNA in copper deficiency-induced repression of chloroplastic CuZn-superoxide dismutase genes in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Physiol.* **54**, 1345–1355.
- Himmelblau, E., Amasino, R.M.**, 2001. Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *J. Plant Physiol.* **158**, 1317–1323.



**Hiraga, K., Kikuchi, G.,** 1982. The Mitochondrial Glycine Cleavage System: Differential Inhibition by Divalent Cations of Glycine Synthesis and Glycine Decarboxylation in the Glycine-CO<sub>2</sub> Exchange. *J. Biochem.* **92**, 937–944.

**Hong, Y., Hu, H.-Y.,** 2007. Effects of the aquatic extracts of *Arundo donax* L. on the growth of freshwater algae. *Allelopathy J.* **20**, 315–326.

**Horst, W.,** 2013. The Multifaceted Challenges of Plant Nutrition, in: Proceedings Book. Presented at the XVII. international Plant Nutrition Colloquium, Istanbul, Turkey.

## I

**IGBP-DIS,** 1998. SoilData(V.0) A program for creating global soil-property databases.

**Initiative Arabidopsis Genome,** 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796.

## J

**Jannin, L., Arkoun, M., Etienne, P., Laîné, P., Goux, D., Garnica, M., Fuentes, M., Francisco, S.S., Baigorri, R., Cruz, F., Houdusse, F., Garcia-Mina, J.-M., Yvin, J.-C., Ourry, A.,** 2013. *Brassica napus* Growth is promoted by *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. seaweed extract: microarray analysis and physiological characterization of N, C, and S metabolisms. *J. Plant Growth Regul.* **32**, 31–52.

**Jannin, L., Arkoun, M., Ourry, A., Laîné, P., Goux, D., Garnica, M., Fuentes, M., Francisco, S.S., Baigorri, R., Cruz, F., Houdusse, F., Garcia-Mina, J.-M., Yvin, J.-C., Etienne, P.,** 2012. Microarray analysis of humic acid effects on *Brassica napus* growth: Involvement of N, C and S metabolisms. *Plant Soil* **359**, 297–319.

## K

**Kabata-Pendias, A., Pendias, H.,** 2001. Trace elements in plants. *Trace Elem. Soils Plants* **73**–98.

**Keeling, A.A., McCallum, K.R., Beckwith, C.P.,** 2003. Mature green waste compost enhances growth and nitrogen uptake in wheat (*Triticum aestivum* L.) and oilseed rape (*Brassica napus* L.) through the action of water-extractable factors. *Bioresour. Technol.* **90**, 127–132.





- Khan, W., Hiltz, D., Critchley, A.T., Prithiviraj, B.,** 2011. Bioassay to detect *Ascophyllum nodosum* extract-induced cytokinin-like activity in *Arabidopsis thaliana*. *J. Appl. Phycol.* **23**, 409–414.
- Khan, W., Rayirath, U., Subramanian, S., Jithesh, M., Rayorath, P., Hodges, D., Critchley, A., Craigie, J., Norrie, J., Prithiviraj, B.,** 2009. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *J. Plant Growth Regul.* **28**, 386–399.
- Kim, D.-J., Smith, S.M.,** 1994. Expression of a single gene encoding microbody NAD-malate dehydrogenase during glyoxysome and peroxisome development in cucumber. *Plant Mol. Biol.* **26**, 1833–1841.
- Klug, A.,** 2010. The discovery of zinc fingers and their development for practical applications in gene regulation and genome manipulation. *Q. Rev. Biophys.* **43**, 1–21.
- Kobayashi, N.I., Saito, T., Iwata, N., Ohmae, Y., Iwata, R., Tanoi, K., Nakanishi, T.M.,** 2013. Leaf senescence in rice due to magnesium deficiency mediated defect in transpiration rate before sugar accumulation and chlorosis. *Physiol. Plant.* **148**, 490–501.
- K. Shrotri, C., Mohanty, P., S. Rathore, V., N. Tewari, M.,** 1983. Zinc deficiency limits the photosynthetic enzyme activities in *Zea mays*. *Biochem. Physiol. Pflanz.* **178**, 213–217.
- Kung, C.-C.S., Huang, W.-N., Huang, Y.-C., Yeh, K.-C.,** 2006. Proteomic survey of copper-binding proteins in *Arabidopsis* roots by immobilized metal affinity chromatography and mass spectrometry. *Proteomics* **6**, 2746–2758.
- Kuper, J., Llamas, A., Hecht, H.-J., Mendel, R.R., Schwarz, G.,** 2004. Structure of the molybdopterin-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism. *Nature* **430**, 803–806.

## L

- Lainé, P., Ourry, A., Macduff, J., Boucaud, J., Salette, J.,** 1993. Kinetic parameters of nitrate uptake by different catch crop species: effects of low temperatures or previous nitrate starvation. *Physiol. Plant.* **88**, 85–92.
- Lanquar, V., Lelièvre, F., Bolte, S., Hamès, C., Alcon, C., Neumann, D., Vansuyt, G., Curie, C., Schröder, A., Krämer, U., Barbier-Brygoo, H., Thomine, S.,** 2005. Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J.* **24**, 4041–4051.
- Laughlin, M.R., Thompson, D.,** 1996. The Regulatory Role for Magnesium in Glycolytic Flux of the Human Erythrocyte. *J. Biol. Chem.* **271**, 28977–28983.



- Liang, H., Yuan, Q., Xiao, Q.,** 2006. Effects of metal ions on myrosinase activity and the formation of sulforaphane in broccoli seed. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **43**, 19–22.
- Lidon, F.C., Henriques, F.S.,** 1993. Effects of copper toxicity on growth and the uptake and translocation of metals in rice plants. *J. Plant Nutr.* **16**, 1449–1464.
- Li, L.-G., Sokolov, L.N., Yang, Y.-H., Li, D.-P., Ting, J., Pandey, G.K., Luan, S.,** 2008. A mitochondrial magnesium transporter functions in Arabidopsis pollen development. *Mol. Plant* **1**, 675–685.
- Li, L., Tutone, A.F., Drummond, R.S., Gardner, R.C., Luan, S.,** 2001. A novel family of magnesium transport genes in Arabidopsis. *Plant Cell Online* **13**, 2761–2775.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D.,** 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* **25**, 402–408.
- Llamas, A., Otte, T., Multhaup, G., Mendel, R.R., Schwarz, G.,** 2006. The Mechanism of Nucleotide-assisted Molybdenum Insertion into Molybdopterin A NOVEL ROUTE TOWARD METAL COFACTOR ASSEMBLY. *J. Biol. Chem.* **281**, 18343–18350.
- Lovitt, B., VanderPorten, E.C., Sheng, Z., Zhu, H., Drummond, J., Liu, Y.,** 2010. Differential effects of divalent manganese and magnesium on the kinase activity of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2). *Biochemistry* **49**, 3092–3100.

## M

- Malagoli, P., Laine, P., Rossato, L., Ourry, A.,** 2005. Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to harvest. II. An  $^{15}\text{N}$ -labelling-based simulation model of N partitioning between vegetative and reproductive tissues. *Ann. Bot.* **95**, 1187–1198.
- Mancuso, S., Azzarello, E., Mugnai, S., Briand, X.,** 2006. Marine bioactive substances (IPA extract) improve foliar ion uptake and water stress tolerance in potted *Vitis vinifera* plants. *Adv. Hortic. Sci.* **2**, 156–161.
- Mariotti, A., Germon, J.C., Hubert, P., Kaiser, P., Letolle, R., Tardieux, A., Tardieux, P.,** 1981. Experimental determination of nitrogen kinetic isotope fractionation: Some principles; illustration for the denitrification and nitrification processes. *Plant Soil* **62**, 413–430.
- Marschner, P.,** 2012. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press.



- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., Suzuki, A., 2010.** Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann. Bot.* **105**, 1141–1157.
- Matile, P., Hortensteiner, S., Thomas, H., Krautler, B., 1996.** Chlorophyll breakdown in senescent leaves. *Plant Physiol.* **112**, 1403.
- Mayland, H.F., Wilkinson, S.R., 1989.** Soil factors affecting magnesium availability in plant-animal systems: A review. *J. Anim. Sci.* **67**, 3437–3444.
- Méchin, V., Consoli, L., Le Guilloux, M., Damerval, C., 2003.** An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. *Proteomics* **3**, 1299–1302.
- Mendel, R.R., 2013.** The molybdenum cofactor. *J. Biol. Chem.* **288**, 13165–13172.
- Mooney, S., Hellmann, H., 2010.** Vitamin B6: Killing two birds with one stone? *Phytochemistry* **71**, 495–501.
- Mora, V., Bacaicoa, E., Zamarreño, A.-M., Aguirre, E., Garnica, M., Fuentes, M., García-Mina, J.-M., 2010.** Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. *J. Plant Physiol.* **167**, 633–642.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A., 1987.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335.
- Munoz-Bertomeu, J., Cascales-Minana, B., Mulet, J.M., Baroja-Fernandez, E., Pozueta-Romero, J., Kuhn, J.M., Segura, J., Ros, R., 2009.** Plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase deficiency leads to altered root development and affects the sugar and amino acid balance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **151**, 541–558.
- Muscolo, A., Sidari, M., Francioso, O., Tugnoli, V., Nardi, S., 2007.** The auxin-like activity of humic substances is related to membrane interactions in carrot cell cultures. *J. Chem. Ecol.* **33**, 115–129.

## N

- Næsted, H., Holm, A., Jenkins, T., Nielsen, H.B., Harris, C.A., Beale, M.H., Andersen, M., Mant, A., Scheller, H., Camara, B., Mattsson, O., Mundy, J., 2004.** Arabidopsis VARIEGATED 3 encodes a chloroplast-targeted, zinc-finger protein required for chloroplast and palisade cell development. *J. Cell Sci.* **117**, 4807–4818.
- Naik, G.R., 1984.** Inactive iron in sugarcane leaves and its influence on enzymatic reactions and chloroplast metabolism. *J. Plant Nutr.* **7**, 785–798.



## O

- O'hara, G.W., Dilworth, M.J., Boonkerd, N., Parkpian, P.,** 1988. Iron-deficiency specifically limits nodule development in peanut inoculated with *Bradyrhizobium sp.* *New Phytol.* **108**, 51–57.
- Olsen, L.I., Palmgren, M.G.,** 2014. Many rivers to cross: the journey of zinc from soil to seed. *Front. Plant Sci.* **5**, 30.
- O'Sullivan, J.N., Ernest, J.,** 2007. Nutrient deficiencies in lesser yam (*Dioscorea esculenta*) characterized using constant-water table sand culture. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **170**, 273–282.

## P

- Palmgren, M.G., Clemens, S., Williams, L.E., Krämer, U., Borg, S., Schjørring, J.K., Sanders, D.,** 2008. Zinc biofortification of cereals: problems and solutions. *Trends Plant Sci.* **13**, 464–473.
- Pasternak, K., Kocot, J., Horecka, A.,** 2010. Biochemistry of magnesium. *J. Elem.* 601–616.
- Peverill, K.I., Sparrow, L.A., Reuter, D.J.,** 1999. Soil Analysis: An Interpretation Manual. Csiro Publishing.
- Piccolo, A., Pietramellara, G., Mbagwu, J.S.C.,** 1997. Use of humic substances as soil conditioners to increase aggregate stability. *Geoderma* **75**, 267–277.
- Pilon, M., Abdel-Ghany, S.E., Van Hoewyk, D., Ye, H., Pilon-Smits, E.A.H.,** 2006. Biogenesis of iron-sulfur cluster proteins in plastids. *Genet. Eng.* **27**, 101–117.
- Pinstrup-Andersen, P.,** 2005. Ethics and economic policy for the food system. *Am. J. Agric. Econ.* **87**, 1097–1112.
- Pottier, M., Masclaux-Daubresse, C., Yoshimoto, K., Thomine, S.,** 2014. Autophagy as a possible mechanism for micronutrient remobilization from leaves to seeds. *Front. Plant Sci.* **5**. doi:10.3389/fpls.2014.00011
- Prasad, A.S., Halsted, J.A., Nadimi, M.,** 1961. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. *Am. J. Med.* **31**, 532–546.
- Proctor, E.A., Ding, F., Dokholyan, N.V.,** 2011. Structural and thermodynamic effects of post-translational modifications in mutant and wild type Cu, Zn superoxide dismutase. *J. Mol. Biol.* **408**, 555–567.
- Project International Rice Genome Sequencing, I.R.G.S.,** 2005. The map-based sequence of the rice genome. *Nature* **436**, 793–800.





**Puglisi, E., Fragoulis, G., Ricciuti, P., Cappa, F., Spaccini, R., Piccolo, A., Trevisan, M., Crecchio, C., 2009.** Effects of a humic acid and its size-fractions on the bacterial community of soil rhizosphere under maize (*Zea mays* L.). *Chemosphere* **77**, 829–837.

**Puig, S., Peñarrubia, L., 2009.** Placing metal micronutrients in context: transport and distribution in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 299–306.

## Q

**Quaggiotti, S., Ruperti, B., Pizzeghello, D., Francioso, O., Tugnoli, V., Nardi, S., 2004.** Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.* doi:10.1093/jxb/erh085

## R

**Rathore, S.S., Chaudhary, D.R., Boricha, G.N., Ghosh, A., Bhatt, B.P., Zodape, S.T., Patolia, J.S., 2009.** Effect of seaweed extract on the growth, yield and nutrient uptake of soybean (*Glycine max*) under rainfed conditions. *South Afr. J. Bot.* **75**, 351–355.

**Ravet, K., Danford, F.L., Dihle, A., Pittarello, M., Pilon, M., 2011.** Spatiotemporal analysis of copper homeostasis in *Populus trichocarpa* reveals an integrated molecular remodeling for a preferential allocation of copper to plastocyanin in the chloroplasts of developing leaves. *Plant Physiol.* **157**, 1300–1312.

**Ray, D.K., Mueller, N.D., West, P.C., Foley, J.A., 2013.** Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *PLoS ONE* **8**, e66428.

**Rayorath, P., Jithesh, M.N., Farid, A., Khan, W., Palanisamy, R., Hankins, S.D., Critchley, A.T., Prithiviraj, B., 2008.** Rapid bioassays to evaluate the plant growth promoting activity of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. using a model plant, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *J. Appl. Phycol.* **20**, 423–429.

**Rayssiguier, Y., Libako, P., Nowacki, W., Rock, E., 2010.** Magnesium deficiency and metabolic syndrome: stress and inflammation may reflect calcium activation. *Magnes Res* **23**, 73–80.

**Reed, G.H., Poyner, R.R., Larsen, T.M., Wedekind, J.E., Rayment, I., 1996.** Structural and mechanistic studies of enolase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 736–743.

**Rendig, V.V., 1984.** Soil fertility and plant nutrition effects on the nutritional quality of crops. *Crops Sources Nutr. Hum.* 61–77.



- Rossato, L., Lainé, P., Ourry, A.**, 2001. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. *J. Exp. Bot.* **52**, 1655–1663.
- Roussos, P.A., Denaxa, N.-K., Damvakaris, T.**, 2009. Strawberry fruit quality attributes after application of plant growth stimulating compounds. *Sci. Hort.* **119**, 138–146.
- Royer Jr, W.E.**, 1994. High-resolution crystallographic analysis of a co-operative dimeric hemoglobin. *J. Mol. Biol.* **235**, 657–681.
- Ruston, D.**, Great Britain. Office for National Statistics. Social Survey Division, Medical Research Council. Human Nutrition Research, Great Britain. Food Standards Agency, 2004. The national diet & nutrition survey: adults aged 19 to 64 years: volume 4: nutritional status (anthropometry and blood analytes), blood pressure and physical activity. TSO, London.

## S

- Sanwal, B.D., Zink, M.W., Stachow, C.S.**, 1964. Nicotinamide adenine dinucleotide-specific isocitric dehydrogenase. A possible regulatory protein. *J. Biol. Chem.* **239**, 1597–1603.
- Sarda, X., Diquelou, S., Abdallah, M., Nesi, N., Cantat, O., Le Gouee, P., Avice, J.C., Ourry, A.**, 2013. Assessment of sulphur deficiency in commercial oilseed rape crops from plant analysis. *J. Agric. Sci.* 1–18. doi:10.1017/S0021859613000105
- Sazawal, S., Black, R.E., Bhan, M.K., Bhandari, N., Sinha, A., Jalla, S.**, 1995. Zinc supplementation in young children with acute diarrhea in India. *N. Engl. J. Med.* **333**, 839–844.
- Scharpenseel, H.W., Eichwald, E., Hauptenthal, C., Neue, H.U.**, 1983. Zinc deficiency in a soil toposequence, grown to rice, at Tiaong, Quezon Province, Philippines. *Catena* **10**, 115–132.
- Schmidt, R.E., Ervin, E.H., Zhang, X.**, 2003. Questions and answers about biostimulants. *Golf Course Manag.* **71**, 91–94.
- Schmidt, W., Santi, S., Pinton, R., Varanini, Z.**, 2007. Water-extractable humic substances alter root development and epidermal cell pattern in Arabidopsis. *Plant Soil* **300**, 259–267.
- Schock, I., Gregan, J., Steinhauser, S., Schweyen, R., Brennicke, A., Knoop, V.**, 2000. A member of a novel Arabidopsis thaliana gene family of candidate Mg<sup>2+</sup> ion transporters complements a yeast mitochondrial group II intron-splicing mutant. *Plant J.* **24**, 489–501.



- Schwarz, G., Schulze, J., Bittner, F., Eilers, T., Kuper, J., Bollmann, G., Nerlich, A., Brinkmann, H., Mendel, R.R.,** 2000. The molybdenum cofactor biosynthetic protein Cnx1 complements molybdate-repairable mutants, transfers molybdenum to the metal binding pterin, and is associated with the cytoskeleton. *Plant Cell Online* **12**, 2455–2471.
- Shankar, A.H., Prasad, A.S.,** 1998. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**, 447S–463S.
- Shaul, O.,** 2002. Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. *Biometals* **15**, 307–321.
- Siberry, G.K., Ruff, A.J., Black, R.,** 2002. Zinc and human immunodeficiency virus infection. *Nutr. Res.* **22**, 527–538.
- Sinclair, A.H., Edwards, A.C.,** 2008. Micronutrient Deficiency Problems in Agricultural Crops in Europe, in: Alloway, B.J. (Ed.), *Micronutrient Deficiencies in Global Crop Production*. Springer Netherlands, pp. 225–244.
- Sirijovski, N., Lundqvist, J., Rosenbäck, M., Elmlund, H., Al-Karadaghi, S., Willows, R.D., Hansson, M.,** 2008. Substrate-binding model of the chlorophyll biosynthetic magnesium chelatase BchH subunit. *J. Biol. Chem.* **283**, 11652–11660.
- Sivasankari, S., Venkatesalu, V., Anantharaj, M., Chandrasekaran, M.,** 2006. Effect of seaweed extracts on the growth and biochemical constituents of *Vigna sinensis*. *Bioresour. Technol.* **97**, 1745–1751.
- Sivitz, A.B., Hermand, V., Curie, C., Vert, G.,** 2012. Arabidopsis bHLH100 and bHLH101 control iron homeostasis via a FIT-independent pathway. *PLoS ONE* **7**, e44843.
- Slovacek, R.E., Monahan, B.C.,** 1983. Reductive activation of fructose-1,6-bisphosphatase and the peroxide effect on chloroplast photosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **224**, 310–318.
- Smith, B.N.,** 1984. Iron in higher plants: Storage and metabolic role. *J. Plant Nutr.* **7**, 759–766.
- Spinelli, F., Fiori, G., Noferini, M., Sprocatti, M., Costa, G.,** 2010. A novel type of seaweed extract as a natural alternative to the use of iron chelates in strawberry production. *Sci. Hortic.* **125**, 263–269.
- Stefl, R., Skrisovska, L., Allain, F.H.-T.,** 2005. RNA sequence- and shape-dependent recognition by proteins in the ribonucleoprotein particle. *EMBO Rep.* **6**, 33–38.
- Steinnes, E.,** 2009. Soils and geomedicine. *Environ. Geochem. Health* **31**, 523–535.
- Swaminathan, R.,** 2003. Magnesium metabolism and its disorders. *Clin. Biochem. Rev.* **24**, 47–66.



**Swift, R.S., Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A., Loeppert, R.H., Soltanpour, P.N., Tabatabai, M.A., Johnston, C.T., Sumner, M.E., 1996.** Organic matter characterization. 1011–1069.

## T

**Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Richardson, J.S., Richardson, D.C., 1983.** Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature* **306**, 284–287.

**Tan, Y.-F., O’Toole, N., Taylor, N.L., Millar, A.H., 2010.** Divalent metal ions in plant mitochondria and their role in interactions with proteins and oxidative stress-induced damage to respiratory function. *Plant Physiol.* **152**, 747–761.

**Tari, L.W., Matte, A., Goldie, H., Delbaere, L.T.J., 1997.** Mg<sup>2+</sup>–Mn<sup>2+</sup> clusters in enzyme-catalyzed phosphoryl-transfer reactions. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **4**, 990–994.

**Tejada-Jiménez, M., Galván, A., Fernández, E., Llamas, Á., 2009.** Homeostasis of the micronutrients Ni, Mo and Cl with specific biochemical functions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 358–363.

**Tejada, M., Gonzalez, J.L., 2004.** Effects of foliar application of a byproduct of the two-step olive oil mill process on rice yield. *Eur. J. Agron.* **21**, 31–40.

**Temple, W.D., Bomke, A.A., 1988.** Effects of kelp (*Macrocystis integrifolia*) on soil chemical properties and crop response. *Plant Soil* **105**, 213–222.

**Teschner, J., Lachmann, N., Schulze, J., Geisler, M., Selbach, K., Santamaria-Araujo, J., Balk, J., Mendel, R.R., Bittner, F., 2010.** A novel role for Arabidopsis mitochondrial ABC transporter ATM3 in molybdenum cofactor biosynthesis. *Plant Cell Online* **22**, 468–480.

**Thomine, S., Vert, G., 2013.** Iron transport in plants: better be safe than sorry. *Curr. Opin. Plant Biol., Physiology and Metabolism* **16**, 322–327.

**Tomatsu, H., Takano, J., Takahashi, H., Watanabe-Takahashi, A., Shibagaki, N., Fujiwara, T., 2007.** An *Arabidopsis thaliana* high-affinity molybdate transporter required for efficient uptake of molybdate from soil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 18807–18812.

## V

**Vallee, B.L., Auld, D.S., 1990.** Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* **29**, 5647–5659.

**Van de Mortel, J.E., Schat, H., Moerland, P.D., van Themaat, E.V.L., van der Ent, S., Blankestijn, H., Ghandilyan, A., Tsiatsiani, S., Aarts, M.G., 2008.**





Expression differences for genes involved in lignin, glutathione and sulphate metabolism in response to cadmium in *Arabidopsis thaliana* and the related Zn/Cd-hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell Environ.* **31**, 301–324.

**Vashchenko, G., MacGillivray, R.T.A.,** 2013. Multi-copper oxidases and human iron metabolism. *Nutrients* **5**, 2289–2313.

## W

**Wallace, A., Romney, E.M., Alexander, G.V., Kinnear, J.,** 1977. Phytotoxicity and some interactions of the essential trace metals iron, manganese, molybdenum, zinc, copper, and boron. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **8**, 741–750.

**Walsh, T., O'Donohoe, T.F.,** 1945. Magnesium deficiency in some crop plants in relation to the level of potassium nutrition. *J. Agric. Sci.* **35**, 254–263.

**Wang, W., Scali, M., Vignani, R., Spadafora, A., Sensi, E., Mazzuca, S., Cresti, M.,** 2003. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis* **24**, 2369–2375.

**Waters, B.M.,** 2011. Moving magnesium in plant cells. *New Phytol.* **190**, 510–513.

**Waters, B.M., Armbrust, L.C.,** 2013. Optimal copper supply is required for normal plant iron deficiency responses. *Plant Signal. Behav.* **8**.

**Waters, B.M., Sankaran, R.P.,** 2011. Moving micronutrients from the soil to the seeds: Genes and physiological processes from a biofortification perspective. *Plant Sci.* **180**, 562–574.

**Watson, J.D., Crick, F.H.,** 1953. Molecular structure of nucleic acids. *Nature* **171**, 737–738.

**Welch, R.M., House, W.A., Ortiz-Monasterio, I., Cheng, Z.,** 2005. Potential for Improving Bioavailable Zinc in Wheat Grain (Triticum Species) through Plant Breeding. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 2176–2180.

**Welch, R.M., Shuman, L.,** 1995. Micronutrient Nutrition of Plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **14**, 49–82.

**White, P.J., Broadley, M.R.,** 2005. Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends Plant Sci.* **10**, 586–593.

**White, P.J., Broadley, M.R.,** 2009. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytol.* **182**, 49–84.



**Wintz, H., Fox, T., Wu, Y.-Y., Feng, V., Chen, W., Chang, H.-S., Zhu, T., Vulpe, C.,** 2003. Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *J. Biol. Chem.* **278**, 47644–47653.

**Wolf, F.I., Cittadini, A.,** 2003. Chemistry and biochemistry of magnesium. *Mol. Aspects Med.* **24**, 3–9.

## Y

**Yamasaki, H., Hayashi, M., Fukazawa, M., Kobayashi, Y., Shikanai, T.,** 2009. SQUAMOSA promoter binding protein-like7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Online* **21**, 347–361.

**Yang, J., Worley, E., Wang, M., Lahner, B., Salt, D.E., Saha, M., Udvardi, M.,** 2009. Natural variation for nutrient use and remobilization efficiencies in switchgrass. *BioEnergy Res.* **2**, 257–266.

**Yruela, I.,** 2009. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Funct. Plant Biol.* **36**, 409. doi:10.1071/FP0828

**Yruela, I.,** 2013. Transition metals in plant photosynthesis. *Metallomics* **5**, 1090–1109.

**Yuan, J.S., Reed, A., Chen, F., Stewart, C.N.,** 2006. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* **7**, 85.

## Z

**Zatta, P., Frank, A.,** 2007. Copper deficiency and neurological disorders in man and animals. *Brain Res. Rev.* **54**, 19–33.

**Zhang, X., Ervin, E.H.,** 2004. Cytokinin-containing seaweed and humic acid extracts associated with creeping bentgrass leaf cytokinins and drought resistance. *Crop Sci.* **44**, 1737.

**Zhao, F.-J., McGrath, S.P.,** 2009. Biofortification and phytoremediation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 373–380.



## Références internet

**ANSES**, 2012. Anses Table Ciqua 2012 Composition nutritionnelle des aliments. Ciqua Fr. Food Comp. Table Version 2012. URL <http://www.ansespro.fr/TableCIQUAL/index.htm> (accessed 2.11.14).

**BLAST: Basic Local Alignment Search Tool** URL [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome) (accessed 2.14.14).

**EBI**. What are sequence features? | Train online [WWW Document]. URL <http://www.ebi.ac.uk/training/online/course/introduction-protein-classification-ebi/protein-classification/what-are-sequence-features> (accessed 10.7.14).

**ExpASY: SIB Bioinformatics Resource Portal - Home** [WWW Document], URL <http://www.expasy.org/> (accessed 5.6.14).

**Harvest Plus**, 2014. HarvestPlus | HarvestPlus is a global leader in reducing hidden hunger (micronutrient malnutrition) by breeding micronutrient-rich food crops. URL <http://www.harvestplus.org/> (accessed 5.22.14).

**Matrix science**, Mascot search engine | Protein identification software for mass spec data. URL <http://www.matrixscience.com/> (accessed 2.11.14).

**NuTech Seed**, LLC URL <http://www.nutechseed.com/index.php?pkey=152> (accessed 10.7.14).

**RefSeq: NCBI Reference Sequence Database** URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/> (accessed 4.22.14).