

N° Ordre : **2936**  
de la thèse

## **THESE**

présentée

**DEVANT L'UNIVERSITE DE RENNES 1**

pour obtenir

le grade de : **DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE RENNES 1**

Mention : **BIOLOGIE**

PAR

**Carine NOQUET**

Équipe d'accueil : UMR INRA-UCBN 950 EVA  
Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions NCS  
Caen

École Doctorale : Vie - Agronomie - Santé

Composante universitaire : IBFA

**Mise en réserve d'azote sous forme de protéines de réserve  
des organes végétatifs (VSP) chez *Medicago sativa* L.  
et *Brassica napus* L. : principaux facteurs de régulation**

Soutenue à Rennes le **9 Décembre 2003** devant la commission d'Examen

### COMPOSITION DU JURY :

**F.R. LARHER**, Professeur, Université de Rennes

**J.F. MOROT-GAUDRY**, Directeur de Recherche INRA, Versailles

**A.M. LIMAMI**, Professeur, Université d'Angers

**A. BOUCHEREAU**, Maître de Conférences, Université de Rennes

**A. OURRY**, Professeur, Université de Caen

**J.C. AVICE**, Maître de Conférences, Université de Caen

Je tiens à témoigner ma reconnaissance à Monsieur le Professeur J. BOUCAUD pour m'avoir accueillie au sein de l'UMR INRA-UCBN 950 EVA Nutritions NCS à l'occasion du démarrage de cette thèse et avant cela en DEA.

J'exprime ma gratitude à Monsieur le Professeur F.R. LARHER qui m'a permis l'accès au DEA Génétique, Adaptation et Productions Végétales de l'Université de Rennes, par lequel j'ai pu ensuite poursuivre en thèse. Je le remercie de la confiance dont il a fait preuve à mon égard jusqu'à ce jour et je lui suis reconnaissante d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je suis très honorée que Monsieur J.F. MOROT-GAUDRY et Monsieur le Professeur A. LIMAMI aient accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Je tiens également à remercier Monsieur A. BOUCHEREAU de l'intérêt qu'il porte à mon travail en acceptant d'en être l'examineur.

J'exprime ma reconnaissance et ma considération à Monsieur le Professeur A. OURRY pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein du laboratoire et pour avoir accepté d'être mon Directeur de thèse. Je lui témoigne ma gratitude pour avoir pris le temps de me faire bénéficier de ses conseils et de ses compétences scientifiques au cours de ces années. J'apprécie qu'il m'ait accordé sa confiance en me laissant une part d'autonomie sur la gestion et la rédaction de ce travail et incitée à prendre mes responsabilités tout en me faisant part de ses idées.

Je remercie sincèrement Monsieur J.C. AVICE de m'avoir encadrée pendant mon stage de DEA et d'avoir continué à me suivre lors de ma thèse. Son implication assidue a contribué à mon évolution, m'a amenée à faire les choix d'orientation de ce travail et à les assumer. Je le remercie particulièrement pour le temps qu'il a consacré aux expérimentations, notamment sur le terrain et aux nombreuses lectures rapides et attentives de l'ensemble de ce manuscrit ainsi que pour ses conseils pour l'enrichir.

J'adresse un grand merci à Monsieur le Professeur J.J. VOLENEC pour son accueil lors de mon séjour de 3 mois au sein du Département d'Agronomie de l'Université de Purdue (USA). Je garderai en mémoire sa disponibilité, sa générosité ainsi que celle de sa famille et de son équipe. Je le remercie particulièrement pour la rapidité avec laquelle il s'est toujours investi dans les corrections des articles concernant la luzerne. Je remercie aussi Suzanne Cunningham pour la formation technique riche et intense dont elle m'a fait bénéficier pendant ce séjour. Nos échanges électroniques m'ont bien souvent réconfortée, soyez en assurés tous les deux.

Ma profonde reconnaissance va également à Laurence ROSSATO, merci pour ta disponibilité, ta présence attentive et tes conseils avisés dans les bons et les moins bons moments. Tes encouragements généreux et sincères et ton amitié sont infiniment précieux. Je n'oublie pas que tu m'as transmis tes connaissances sur le colza notamment lors des différentes étapes de l'expérimentation au champ. C'est aussi grâce à ta détermination et à ton aide que j'ai pu participer avec tant de plaisir à mon premier congrès. Merci d'avoir relu ce manuscrit et d'y avoir apporté tes suggestions.

Je remercie Jean-Marie FETROT, conseiller en recrutement de l'association Bernard Grégory pour m'avoir aidée à rédiger le nouveau chapitre de thèse joint à la fin de ce manuscrit et à prendre du recul sur mon expérience de doctorante.

Je tiens également à exprimer ma gratitude à :

- Monsieur le Professeur J.P. BILLARD pour son suivi attentif et ses conseils en particulier dans les moments délicats. Je le remercie pour sa lecture attentive et ses suggestions concernant les conclusions de ce manuscrit.
- Monsieur le Professeur C. HUAULT pour ses encouragements depuis le DEA.
- Christine GOURBE pour ses services rendus, merci pour ta présence et ton soutien.
- Mademoiselle J. LE SAOS et Philippe LAINE grâce à qui j'ai pu réaliser mon tout premier stage au sein de l'UMR. Merci Philippe pour ton aide au cours de l'expérimentation au champ.
- Patrick BEAUCLAIR pour son aide pendant les nombreuses récoltes et surtout lors des broyages manuels et extractions de protéines du colza. J'ai apprécié ton soutien technique et moral, toujours dans la bonne humeur.
- Marie-Paule HENRY pour sa contribution aux récoltes, aux broyages mécaniques et son temps passé pour les analyses spectrométriques.
- Frédéric MEURIOT que je remercie particulièrement pour sa contribution à mon travail lors de son DEA et son soutien pendant le début de ma thèse.
- Sébastien CAILLOT, Mickaël HUGON, Marie-Laure PORTET, pour leur rigueur et le temps consacré aux expérimentations sur la luzerne.
- Sébastien GALOPIN pour son aide technique pendant mon DEA, Christelle LE DANTEC pour ses conseils en biologie moléculaire et tous les stagiaires venus participer à nos récoltes et expérimentations (Olivia, Olivier, Alexandre, Jérôme)
- Philippe MALAGOLI, collègue de thèse, pour avoir partagé avec moi les différentes étapes de l'expérimentation au champ ainsi que pour sa compagnie joyeuse pendant les stages au CIES dans le cadre du monitorat.

J'adresse aussi toute ma sympathie à tous les autres étudiants qui ont passé leur thèse ou sont en cours de doctorat à l'UMR : Florence, Véronique, Isabelle, Nicolas, Fabien. Je fais une "spéciale dédicace" à Bertrand pour sa bonne humeur communicative et ses talents de "pop-star-académicien", à Julie pour ses sincères encouragements (belle thèse à vous 2!), ainsi qu'à Céline pour son aide spontanée et dynamique notamment en chambre froide lors des broyages.

Je remercie également l'ensemble des enseignants-chercheurs de l'UMR et plus spécialement ceux qui m'ont permis de m'initier à l'enseignement dans le cadre du monitorat en me faisant bénéficier de leur expérience : J.C. AVICE, P. LAINE, E. LE DEUNFF, J.B. CLIQUET... J'associe à cette occasion Mesdames MOUTON-CHEVALLIER et LOUISE pour les remercier de leur confiance.

J'ai une petite pensée pour Michèle COUSTENOBLE qui a aussi participé aux broyages mécaniques de nos échantillons et pour Dominique BALLOIS, notre "bricoleur-dépanneur". Merci à Isabelle BIAOU, Nathalie DUBOSQ et Sandrine SVELON, trois mamans..., j'ai relativisé bien des choses en les écoutant me parler de leur petite famille...

Enfin, je remercie pour leur soutien, leur compréhension et leur patience mes proches amis. Je dédie ce travail à mes parents et à mon frère qui m'ont appris qu'avec courage et persévérance, on a raison de tout. Je leur adresse mes plus affectueuses pensées et leur témoigne mon profond respect, merci pour vos encouragements constants tout au long de ces années.

## ABREVIATIONS

---

ABA : Acide abscissique	MS ou DM ou DW : Matière sèche
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire	N : Azote
Amp : Ampicilline	NBT : p-nitro blue tetrazolium chloride
APS : Ammonium persulfate	PAGE : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
ARNm (ou mRNA) : Acide ribonucléique messenger	PAR : Rayonnement photosynthétiquement actif
ATP : Adénosine triphosphate	pb : paire de bases
BCIP : 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate p-toluidine salt	PBS : Tampon phosphate salin
BET : Bromure d'éthidium	PCR : Polymerase chain reaction (ou réaction de polymérisation en chaîne)
BSA : Sérum albumine bovine	PGT : Tampon phosphate salin, gélatine et Tween
BSP : Bark storage protein (protéine de réserve de l'écorce)	Pfr : forme active du phytochrome
d : days (jours)	Pr : forme inactive du phytochrome
dCTP : Désoxyribocytosine triphosphate	PM : Poids moléculaire
DEPC : Diéthyl pyrocarbonate	PMSF : Phényl méthyl sulfonyl fluorure
dNTP : mélange équimolaire de désoxyribonucléotides triphosphate	PNPP : Phosphate p-nitrophényle
DTT : Dithiothréitol	PR-protein : pathogenesis related protein
EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique	PVDF : Polyvinylidène difluorure
ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay	PVPP : Polyvinyl-poly pyrrolidone
EMHV : Esters méthyliques d'huile végétale	RubisCO : Ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase
IgG : Immunoglobuline de type G	SDS : Dodécyl sulfate de sodium
IPTG : Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactoside	SSC : Sodium trisodium citrate salin
IRMS : Isotope ratio mass spectrometer	SSP : Seed storage protein (protéine de réserve des graines)
JA : Jasmonic acid (acide jasmonique)	TAE : Tris-acétate
Kb : kilobases (1000 pb)	TBS : Tampon tris salin
kDa : kilodalton	TBST : Tampon tris salin et Tween
LB : milieu de Luria Bertani	TCA : Acide trichloroacétique
MAT : Matière azotée totale	TE : Tris-EDTA
MeJA : Méthyl-jasmonate	TEMED : N, N, N', N'-tétraméthyléthylène diamine
MOPS : Acide 3-(N-morpholino) propane sulfonique	Tris : Tri-(hydroxyméthyl)-aminométhane
	UV : ultra-violet
	VSP : Vegetative storage proteins (protéines de réserve des organes végétatifs)
	Xgal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside

# SOMMAIRE

---

---

<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	1
<b>CHAPITRE I : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	5
I- QUELQUES RAPPELS AGRONOMIQUES CONCERNANT LA CULTURE DE LUZERNE OU DE COLZA .....	5
I-A- Physiologie et croissance de la luzerne .....	5
I-B- Physiologie et croissance du colza.....	7
II- IMPORTANCE DES RESERVES AZOTEES ET MISE EN EVIDENCE DES PROTEINES DE RESERVE DES TISSUS VEGETATIFS (VSP : VEGETATIVE STORAGE PROTEINS) .....	10
II-A- Utilisation des réserves azotées et caractérisation des VSP chez la luzerne.....	10
II-B- Utilisation des réserves azotées et caractérisation d'une VSP chez le colza .....	13
III- LES PROTEINES DE RESERVE DES ORGANES VEGETATIFS (VSP = VEGETATIVE STORAGE PROTEIN): Caractérisations, fonctions et régulations.....	16
III-A- Définition et caractérisation.....	16
III-B- Fonctions physiologiques des VSP .....	18
III-C- Facteurs de régulation de l'accumulation des VSP .....	22
IV- CONCLUSION ET OBJECTIFS DE RECHERCHE .....	30
<b>CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES</b> .....	32
I- CONDITIONS DE CULTURE ET PROTOCOLES EXPERIMENTAUX.....	32
I-A- Mise en place de la culture de luzerne en conditions contrôlées (Chapitres III et IV) .....	32
I-B- Mise en place de la culture de colza en conditions de plein champ (Chapitre V).....	33
I-C- Protocoles expérimentaux.....	33
II- METHODES D'ANALYSE .....	37
II-A- Quantification de l'azote total, de l'azote absorbé et mesure de la répartition de l'azote au sein de la plante .....	37
II-B- Dosage et analyse électrophorétique des protéines solubles et des VSP.....	39
II-C- Mise au point d'une méthode de dosage des VSP de luzerne par ELISA .....	44
II-D- Méthode d'analyse du niveau d'expression des transcrits 32 et 57 kDa.....	46
II-E- Exploitation statistique des données.....	50

**CHAPITRE III : EFFETS DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ET DES  
SIGNAUX ENDOGENES SUR L'ABSORPTION D'AZOTE ET  
L'ACCUMULATION DE PROTEINES DE RESERVE DES ORGANES  
VEGETATIFS CHEZ *MEDICAGO SATIVA* (Article 1) .....51**

I- INTRODUCTION .....	53
II- MATERIALS AND METHODS .....	55
II-A- Plant material and culture.....	55
II-B- Influence of photoperiod, low temperature, high N and MeJA on N partitioning and VSP accumulation .....	55
II-C- Tissue sampling.....	56
II-D- Protein extraction and analysis.....	56
II-E- VSP quantification by ELISA and comparison with image analysis of SDS-PAGE .....	56
II-F- Analysis of $\beta$ -amylase transcript level.....	57
II-G- Calculation of N partitioning in plant .....	58
II-H- Statistical analysis .....	59
III- RESULTS .....	59
III-A- Effects on growth and N partitioning in plant .....	59
III-B- Effects on soluble protein content and VSP accumulation in the taproot.....	60
III-C- Effects on $\beta$ -amylase transcript level .....	61
IV- DISCUSSION .....	61

**CHAPITRE IV : INFLUENCE DE L'HEMEROPERIODE SUR L'ABSORPTION  
D'AZOTE ET L'ACCUMULATION DE PROTEINES DE RESERVE DES  
ORGANES VEGETATIFS CHEZ DEUX VARIETES DE *MEDICAGO SATIVA*  
(Article 2) .....64**

I- INTRODUCTION .....	67
II- MATERIALS AND METHODS .....	68
II-A- Plant material and application of photoperiod treatments.....	68
II-B- Tissue sampling.....	69
II-C- Protein extraction and analysis.....	69
II-D- Analysis of vsp 57 kDa ( $\beta$ -amylase) and vsp 32 kDa transcripts levels .....	70
II-E- Calculation of N partitioning in plants .....	71
II-F- Statistical analysis.....	71
III- RESULTS .....	72
III-A- Experiment I.....	72
III-B- Experiment II .....	74
IV- DISCUSSION .....	74

**CHAPITRE V : EFFET DU BOULEVERSEMENT DES RELATIONS SOURCE-PUITS  
SUR LA REPARTITION D'AZOTE ET L'ACCUMULATION D'UNE PROTEINE  
DE RESERVE DES ORGANES VEGETATIFS CHEZ *BRASSICA NAPUS*  
(Article 3) .....78**

I- INTRODUCTION .....	81
II- MATERIALS AND METHODS .....	83
II-A- Experimental site.....	83
II-B- Experimental procedure and harvest .....	83
II-C- N and <sup>15</sup> N analysis .....	84
II-D- Electrophoretic analysis of soluble proteins.....	84
II-E- Statistical analysis.....	85
III- RESULTS .....	85
III-A- Biomass accumulation .....	85
III-B- Amount of total N in the whole plant.....	86
III-C- <sup>15</sup> N amount in the whole plant and allocation .....	86
III-D- N concentration.....	87
III-E- 23 kDa VSP accumulation .....	88
IV- DISCUSSION .....	89

**CHAPITRE VI : SYNTHESE DES RESULTATS ET DISCUSSION GENERALE.....94**

I- REGULATION DE L'ACCUMULATION DES VSP CHEZ LA LUZERNE.....	96
I-A- Alimentation azotée.....	97
I-B- Abaissement de la température .....	99
I-C- Héméroperiode.....	100
I-D- Recherche des mécanismes de perception et de transduction du signal "jours courts" .....	102
I-E- Rôle du MeJA .....	106
II- REGULATION DE L'ACCUMULATION DE LA VSP CHEZ LE COLZA.....	108
II-A- Cycle ontogénétique normal.....	111
II-B- Effet d'une réduction de la quantité de tissus source.....	112
II-C- Effet d'une réduction de la quantité de tissus présentant des caractéristiques de puits pour l'azote .....	114
II-D- Facteurs de régulation de l'accumulation de la VSP .....	118

**CHAPITRE VII : CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES DE  
RECHERCHE.....120**

I- CONCLUSIONS GENERALES .....	120
--------------------------------	-----

II- PERSPECTIVES DE RECHERCHE.....	124
II-A- Mise en réserve d'azote et mobilisation vers les tissus en développement .....	124
II-B- Signaux impliqués dans l'induction des VSP .....	125
II-C- Autres rôles des VSP .....	126

## **CHAPITRE VIII : VALORISATION DES COMPETENCES : UN NOUVEAU**

<b><u>CHAPITRE DE THESE</u></b> .....	129
I- CADRE GENERAL ET ENJEUX DE LA THESE .....	130
II- DEROULEMENT, GESTION ET COUT DU PROJET .....	132
III- COMPETENCES, SAVOIR FAIRE, QUALITES PROFESSIONNELLES ET PERSONNELLES .....	133
IV- RESULTATS, IMPACT DE LA THESE.....	136
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	138

# ***INTRODUCTION GENERALE***

---

---

## INTRODUCTION GENERALE

---

---

Mon travail de thèse s'est effectué à l'UMR INRA-UCBN 950 EVA de CAEN dont la thématique générale est centrée sur l'étude de la nutrition azotée des espèces cultivées en relation avec le métabolisme carboné. Elle s'inscrit dans le cadre du champ thématique I du schéma stratégique du Département EA : "Ecophysiologie et conduite des cultures" traitant plus particulièrement de l'Etude de la réponse des plantes aux contraintes du milieu, métabolisme et nutrition minérale. La nutrition et le métabolisme de l'azote font partie des principaux thèmes de recherche traités par l'UMR, avec pour objectif principal l'étude intégrée de l'utilisation de l'azote chez les espèces fourragères telles que la luzerne ou chez une espèce oléagineuse : le colza d'hiver.

Pour financer cette étude, j'ai bénéficié d'une allocation du Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche qui m'a également permis d'obtenir un poste de monitrice en suivant la formation du Centre d'Initiation à l'Enseignement Supérieur. Par ailleurs, ce travail doctoral a permis de développer une collaboration initiée avec l'UMR depuis 1993, avec l'équipe du Professeur Volenec du Département d'Agronomie de la Purdue University (Indiana, USA) qui m'a accueillie pendant 3 mois lors de ma première année de thèse (Mai à Juillet 2000).

La luzerne (*Medicago sativa* L.) appartient à l'ordre des Fabales ou légumineuses. Il s'agit d'une plante vivace de la famille des Fabacées (Papilionacées) cultivée essentiellement pour la production de fourrage, en culture pure ou en mélange, le plus souvent avec des graminées (dactyle, fétuque élevée ou brome). Cette espèce est l'une des plantes fourragères les plus répandues dans le monde avec 33 millions d'hectares en culture pure. Derrière l'Amérique du Nord (13 millions d'hectares) et du Sud (7,8 millions d'hectares), l'Europe représente environ 25 % de la production mondiale. En France, après une importante chute des surfaces de luzerne amorcée au début des années 1960, la situation s'est stabilisée dans les années 1990 avec 600 000 hectares en culture pure.

Adaptée à la production de foin, la luzerne peut être pâturée, ensilée ou déshydratée. La culture de la luzerne présente un intérêt agronomique important qui repose sur un bon rapport production/valeur nutritive du fourrage, des besoins en traitements phytosanitaires faibles et une adaptation à des conditions pédo-climatiques variées. De plus, et à l'exception de carence avérée du sol en azote ou en matière organique pouvant nécessiter un léger apport au semis (de l'ordre de 15 à 20 kg N.ha<sup>-1</sup>), la capacité de la luzerne à pouvoir fixer l'azote atmosphérique (*via* la mise en place d'une symbiose avec *Rhizobium meliloti* au niveau racinaire) fait que cette culture ne nécessite pas d'engrais azoté. La teneur moyenne en matières azotées totales (MAT) est de 20 %, expliquant que,

sous les climats tempérés, cette culture a le plus haut rendement en protéines à l'hectare : de 2 à 2,5 t.ha<sup>-1</sup> pour un rendement de 12 t de matière sèche.ha<sup>-1</sup>. Sa composition en acides aminés est en outre bien équilibrée (les acides aminés essentiels pour l'alimentation animale sont tous présents dans la matière azotée de la luzerne). Enfin, et de manière plus récente, la luzerne est utilisée pour la production de pigments ou de molécules d'intérêt pharmacologique lui conférant un attrait industriel non négligeable (Khouidi *et al.*, 1999).

Le colza (*Brassica napus* L.), de l'ordre des Rhoeadales, appartient à la famille des Brassicacées (Crucifères). Il s'agit d'une oléoprotéagineuse qui résulte de l'hybridation naturelle entre le chou (*B. oleracea* L.) et la navette (*B. campestris* L.). Les variétés de printemps sont considérées comme des plantes annuelles et celles d'hiver (c'est-à-dire la plupart des variétés de colza cultivées en Europe) comme des bisannuelles.

Le colza est cultivé pour ses fruits (siliques) qui comportent des graines contenant environ 50 % d'huile. Une fois l'huile extraite, les résidus des graines, très riches en matières azotées (35 % à 40 % de protéines) sont utilisés comme tourteau destiné à l'alimentation animale. La consommation de tourteaux de colza en Europe est d'environ 5,5 millions de tonnes, soit 15 % de la consommation européenne totale. Ils peuvent se substituer en partie aux farines animales désormais interdites. Il existe aussi des variétés fourragères, à croissance rapide, consommées par le bétail ou utilisées comme engrais vert. Enfin, lorsqu'elles présentent une bonne résistance au froid, certaines variétés peuvent aussi servir de culture "piège à nitrate" (culture dérobée) pendant la période automno-hivernale avant le semis d'une céréale de printemps.

La superficie mondiale ensemencée en colza consacré à la production de graines est de 25 millions d'hectares pour une production d'environ 35 millions de tonnes (12 millions de tonnes d'huile et environ 20 millions de tonnes de tourteaux). La Communauté Européenne (où la production a augmenté de 50 % depuis 1990), la Chine, l'Inde et le Canada représentent 85 % de la production mondiale de graines. En France, la superficie cultivée en colza était de 1,3 millions d'hectares en 1999 pour une production de 4,4 millions de tonnes de graines avec des rendements compris entre 30 et 35 q.ha<sup>-1</sup>. La production de colza s'est en outre orientée vers une utilisation pour la fabrication de biocarburants (Esters Méthyliques d'Huile Végétale ou EMHV : diester qui constitue une énergie renouvelable et biodégradable) avec actuellement 300 000 hectares cultivés en jachère industrielle en France. Cependant, la production de colza a dû faire appel à la sélection variétale afin d'obtenir des huiles jugées aptes à la consommation humaine (issues de variétés dites double zéro "00", c'est-à-dire sans acide érucique et à basse teneur en glucosinolates) et d'augmenter la valeur énergétique du tourteau pour étendre son utilisation dans l'alimentation animale. Actuellement, les variétés riches en acide érucique connaissent un regain d'intérêt lié aux propriétés lubrifiantes de leurs huiles (utilisation potentielle comme lubrifiant moteur).

Par ailleurs, il est généralement admis que cette espèce, qualifiée de nitrophile, possède des capacités élevées d'absorption du  $\text{NO}_3^-$  mais une fois absorbé, une proportion relativement faible de cet élément est utilisé pour le remplissage des siliques. Cette mauvaise efficacité d'utilisation des fertilisants azotés conduit donc à des pertes conséquentes dans l'environnement. C'est pourquoi les recommandations actuelles préconisent de limiter cet apport en période printanière. Ainsi, la gestion raisonnée de la fertilisation azotée, considérée excessive ( $180 \text{ kg N.ha}^{-1}$  en moyenne) apparaît nécessaire afin, entre autres, de limiter les risques de pollution nitrique par lixiviation. Dans ce but, l'utilisation de la "Réglotte azote" du CETIOM permet de calculer les doses d'azote optimales à apporter en fonction des besoins de la culture (définis par la production de biomasse).

L'absorption d'azote est très fortement affectée par une défoliation chez la luzerne ou lors de la transition florale chez le colza. La croissance après coupe, chez la luzerne et le remplissage des graines, chez le colza, nécessitent donc la mobilisation de réserves azotées préalablement accumulées par la plante. Une meilleure compréhension de la régulation de cette mise en réserve d'azote peut contribuer à une optimisation de l'utilisation d'azote par les végétaux cultivés. Ainsi, parmi les composés azotés potentiellement impliqués dans la mise en réserve chez la luzerne, les protéines s'avèrent quantitativement importantes au cours de la phase précoce après défoliation. Il en est de même chez le colza à la floraison. De plus, la caractérisation de protéines particulières ayant une fonction de réserve (protéines de réserve des organes végétatifs ou VSP pour Vegetative Storage Protein) a permis l'acquisition de données sur le rôle de l'azote stocké sous forme protéique et sa remobilisation vers les organes en développement chez les 2 espèces.

Dans un tel contexte, la recherche développée dans le cadre de ce travail de thèse visait à étudier plus précisément l'induction de la synthèse de ces VSP par différents facteurs environnementaux et endogènes chez les 2 espèces pré-citées. Ainsi, l'ensemble de ces résultats a permis de distinguer le rôle des VSP et la régulation de leur accumulation en déterminant leur importance lors de la reprise de croissance au printemps ou après une coupe chez la luzerne ou lors de la formation de tissus reproducteurs chez le colza.

Après une présentation des caractéristiques physiologiques et agronomiques existants chez les 2 modèles végétaux retenus dans cette étude, l'analyse bibliographique (Chapitre I) fera le point sur les connaissances concernant les flux azotés dans les différents organes au cours de la repousse au printemps ou après coupe chez la luzerne et au cours du remplissage des graines chez le colza. Elle s'intéressera plus particulièrement aux VSP mises en évidence chez ces 2 espèces suivi d'un bilan des connaissances relatives à ces protéines particulières chez d'autres herbacées et chez les espèces ligneuses. Enfin, les données bibliographiques concernant les facteurs de régulation de la synthèse des VSP chez ces différents groupes botaniques seront plus précisément abordées. Ceci nous amènera ensuite à étudier le rôle potentiel de différents signaux environnementaux et hormonaux

sur la régulation de l'accumulation de VSP en se focalisant plus particulièrement sur l'incidence de l'héméroperiode chez la luzerne et sur l'effet de perturbations des relations source-puits chez le colza.

L'ensemble de ces travaux de thèse s'est traduit par la publication ou la soumission des 3 articles scientifiques suivants correspondant aux 3 chapitres de résultats (Chapitre III, IV et V) présentés dans ce document :

1- *Effects of environmental factors and endogenous signals on N uptake, N partitioning and taproot VSP accumulation in Medicago sativa*. **Noquet C, Avice JC, Ourry A, Volenec JJ, Cunningham SM, Boucaud J** (2001). Australian Journal of Plant Physiology, 28, 4, 279-287.

2- *Short-day photoperiod induces changes in N uptake, N partitioning and accumulation of vegetative storage proteins in two Medicago sativa cultivars*. **Noquet C, Meuriot F, Caillot S, Avice JC, Ourry A, Cunningham SM, Volenec JJ** (2003). Functional Plant Biology, 30, 853-863.

3- *Effects of altered source-sink relationships on N allocation and VSP accumulation in Brassica napus L.* **Noquet C, Avice JC, Rossato L, Beauclair P, Henry MP, Ourry A**. Plant science, soumis en Août 2003.

Par ailleurs, lors de ce travail doctoral, ma contribution à d'autres travaux de recherche, sur une thématique proche, s'est traduite par une participation aux articles suivants qui ne seront pas détaillés dans ce manuscrit :

- *Methyl jasmonate alters N partitioning, N reserves accumulation and induces gene expression of a 32 kDa vegetative storage protein which has chitinase activity in Medicago sativa L. taproots*. **Meuriot F, Noquet C, Avice JC, Volenec JJ, Cunningham SM, Sors TG, Caillot S, Ourry A** (2003). Physiologia Plantarum, sous presse.

- *Vegetative Storage Proteins in overwintering storage organs of forage legumes: roles and regulation*. **Avice JC, Le Dily F, Goulas E, Noquet C, Meuriot F, Volenec JJ, Cunningham SM, Sors TG, Dhont C, Castonguay Y, Nadeau P, Bélanger G, Chalifour F-P, Ourry A**. Canadian Journal of Botany, article de synthèse soumis en Juin 2003.

Enfin, mon activité doctorale s'est traduite par plusieurs participations à différents congrès :

- *Effects of photoperiod, low temperature and N nutrition on VSP accumulation in taproot of alfalfa*. **Avice JC, Noquet C, Ourry A, Volenec JJ** (Février 2001). 19<sup>th</sup> International Grassland Congress, Brésil (Affiche).

- *N uptake, N partitioning and N storage in two Medicago sativa L. cultivars are influenced by short photoperiod*. **Noquet C, Meuriot F, Avice JC, Volenec JJ, Cunningham SM, Ourry A** (Juillet 2001). 6<sup>th</sup> International symposium of inorganic nitrogen assimilation, Reims, France (Affiche).

- *Nitrogen storage and remobilization in Brassica napus L. during the growth cycle: nitrogen fluxes within the plant, changes in soluble protein patterns and influence of reproductive sink tissue removal*. **Noquet C, Rossato L, Malagoli P, Laine P, Avice JC, Beauclair P, Henry MP, Ourry A** (Juillet 2003). 11<sup>th</sup> International Rapeseed Congress, Copenhague, Danemark (Communication orale).

# ***CHAPITRE I : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE***

---

---

## **CHAPITRE I :**

### **ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

---

#### **I- QUELQUES RAPPELS AGRONOMIQUES CONCERNANT LA CULTURE DE LUZERNE ET DE COLZA**

##### **I-A- Physiologie et croissance de la luzerne**

###### **I-A-1- Cycle de développement**

Les époques de semis se situent soit en fin d'été-début d'automne soit au printemps, dès que le sol commence à se réchauffer, en général vers fin mars-début avril. La germination se produit dès que la température est légèrement positive (1 à 2°C), avec un optimum se situant entre 19 et 25°C. A la levée, deux cotylédons émergent puis une première feuille unifoliée, suivie par des feuilles composées de trois folioles attachées à la tige par un pétiole. Une tige secondaire se développe à partir du bourgeon axillaire de la première feuille et deux autres au niveau des cotylédons. Des tiges secondaires naissent également à partir des premières feuilles trifoliées. Cet ensemble de tiges forme le collet de la plante (Figure I-1A). Les stades physiologiques de la luzerne sont décrits dans la figure I-1B.

La croissance des jeunes plantes est rapide entre 20 et 30°C. Cette température optimale diminue ensuite sur les plantes plus âgées et se situe autour de 15 à 25°C. En dessous de 10°C et au-delà de 35°C, la croissance est fortement ralentie (Mauriès, 1994). Le nombre de tiges par pied de luzerne augmente avec l'âge de la plante. L'année du semis, il passe de 2-4 à 6-7 après 4 coupes. L'année suivante, 5 à 8 tiges sont produites par pied. A partir de l'automne qui suit le semis, débute une période de repos végétatif. La plante accumule dans le collet et le système racinaire des réserves carbonées et azotées qui lui permettent de résister à des températures de l'ordre de -20°C et qui contribuent à la repousse après défoliation ou à la reprise de croissance printanière (Ourry *et al.*, 1994 ; Volenec *et al.*, 1996). Ainsi, l'aptitude à la repousse dépend, notamment en l'absence d'autres facteurs limitants, des teneurs initiales du pivot en amidon et en protéines solubles (Avice *et al.*, 1997b). Au printemps, la végétation repart dès que la température dépasse 5°C, la croissance s'accéléralant au fur et à mesure de l'élévation de la température. La racine pivotante de la luzerne développe des racines secondaires plus ou moins ramifiées et l'ensemble possède une forte capacité d'enracinement (jusqu'à 10 m), ce qui lui permet de résister

A



B

STADE		DESCRIPTION
végétatif		Absence totale de boutons floraux.
début bourgeonnement		Apparition des boutons floraux. On peut sentir le bourgeon floral sous les doigts en saisissant l'extrémité d'une tige. Sur 20 tiges cueillies au hasard, 4 présentent des boutons floraux.
bourgeonnement		Sur 20 tiges cueillies au hasard, 16 ont des boutons floraux à leur extrémité.
début floraison		Sur 20 tiges cueillies au hasard, 10 d'entre elles présentent un liséré violet.
floraison		Sur 20 tiges cueillies au hasard, 16 ont des fleurs épanouies.



**Figure I-1** : A- Collet de luzerne en gros plan. B- Stades physiologiques de la luzerne (Mauriès, 1994).

à une sécheresse importante (Mauriès, 1994). Comme dans le cas des autres légumineuses, des nodosités abritant des bactéries symbiotiques se développent sur les racines permettant la fixation du N<sub>2</sub>.

Les luzernes pures ou associées à des graminées ont une production satisfaisante en moyenne pendant 4 ou 5 années consécutives (Mauriès et Paillat, 1997). Certaines parcelles sont conservées jusqu'à 10 ans quand elles ne sont exploitées qu'en foin. Au-delà de 3 ans, la production a tendance à diminuer et semble affectée par un accroissement de la compétition intra-spécifique conduisant à une réduction de la densité des plantes par unité de surface.

### **I-A-2- Fertilisation azotée et rendement (relation productivité / qualité)**

La nutrition azotée de cette espèce est essentiellement assurée par la voie de la fixation symbiotique et minoritairement par une absorption racinaire de l'azote minéral. Pour 13 t de MS annuelle, les besoins sont en moyenne de 430 kg.ha<sup>-1</sup>. Les apports d'azote, lorsqu'ils existent, sont réalisés au printemps afin de stimuler la pousse de premier cycle (Mauriès et Paillat, 1997) et de favoriser la mise en place des nodules symbiotiques. Cependant, une fertilisation azotée minérale ou apportée par des matières organiques n'a pas d'effet ni sur le rendement (Justes *et al.*, 2002) ni sur la qualité (par exemple sur la teneur en azote). L'enracinement profond et la pérennité de la luzerne lui confèrent un rôle potentiel dans la protection de l'environnement par sa capacité à piéger les nitrates du sol (Mauriès et Paillat, 1997).

Le rendement des luzernières dépend de la croissance de la plante et de sa morphologie. Il est fonction du nombre de plantes par unité de surface, du nombre de tiges par plante et de la biomasse respective de ces différentes tiges (Mauriès, 1994). En moyenne, le rendement d'une luzerne pure est de 9 à 12 t de MS.ha<sup>-1</sup> en culture non irriguée, avec trois coupes (cycles) par an. Les rendements totaux d'une luzerne, cultivée pure ou associée à une graminée sont comparables (Mauriès, 1994). La production des luzernières est extrêmement variable en fonction des conditions pédo-climatiques et des pratiques agronomiques. La valeur énergétique de la luzerne est avant tout déterminée par le rapport feuilles/tiges car les feuilles sont plus riches en nutriments présentant une meilleure digestibilité pour les animaux. Ce rapport est directement lié à la croissance de la biomasse et pour une biomasse donnée, il est identique en culture sèche ou irriguée (Lemaire et Allirand, 1993 ; Mauriès, 1994). Ainsi, toute augmentation de production à une coupe donnée, suite à une récolte plus tardive ou à une croissance plus rapide de la luzerne se traduit par une diminution du rapport feuilles/tiges et donc de la valeur énergétique de la récolte.

Par ailleurs, sa digestibilité est essentiellement déterminée par le pourcentage de feuilles ou par le rapport feuilles/tiges (Lemaire et Allirand, 1993). En été, la digestibilité des repousses a tendance à augmenter en raison de la diminution de croissance de la plante (raccourcissement des

entre-nœuds). Dès lors, l'augmentation de croissance obtenue par irrigation se traduit par une diminution de la qualité. La culture irriguée permet 4 coupes par an et un rendement de l'ordre de 15 à 16 t de MS par an. Dans le cas d'un système d'exploitation à trois cycles de coupe-repousse, le premier cycle représente 50 % de la production totale, le deuxième 30 % et le troisième 20 % (Mauriès, 1994). Plus la date de récolte du premier cycle est tardive, plus le rendement en MS est élevé. Cette augmentation se traduit cependant par une diminution régulière de la valeur alimentaire (Mauriès, 1994). Le rendement est donc un compromis entre la récolte de MS et sa valeur nutritive à un instant donné. La date de première coupe et les intervalles entre coupes permettent de moduler quantité et qualité récoltées.

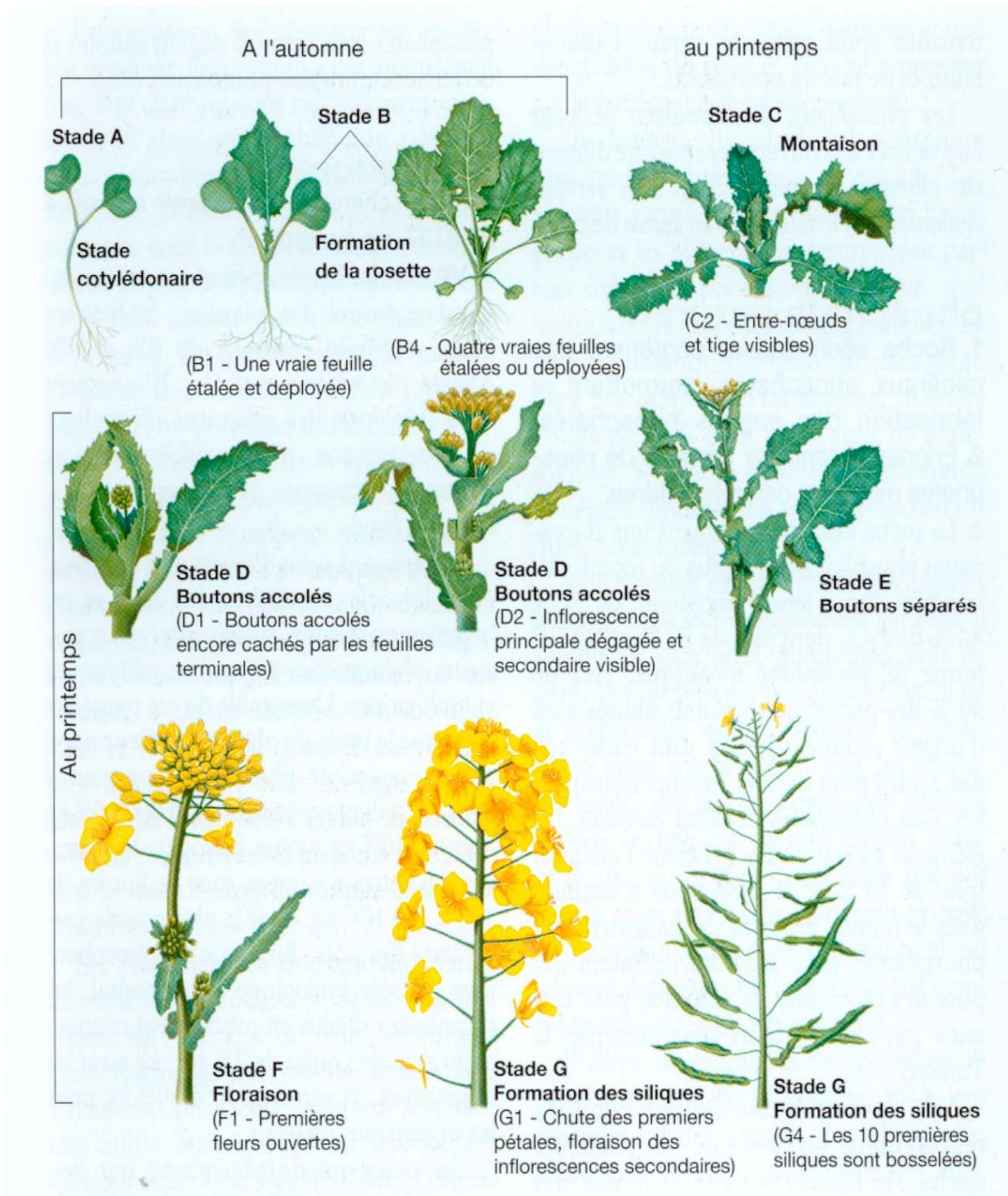
A l'automne, les plantes entrent en dormance (aptitude corrélée positivement à la résistance au froid). Le collet et le système racinaire subissent des changements morphologiques et physiologiques les rendant capables de résister à des stress tels que des températures de  $-20^{\circ}\text{C}$  (Mauriès, 1994). Ce phénomène est initié par une héméropériode courte et se développe dès que la température de l'air tombe à  $10^{\circ}\text{C}$ , le niveau maximum de résistance au froid étant atteint au moment de l'apparition de gelées. Puis, au printemps, le processus de protection contre le froid va s'inverser et l'entrée en végétation s'accélérer à partir de  $5^{\circ}\text{C}$ . Aux Etats-Unis et au Canada, et plus généralement dans les régions à hiver rigoureux, la dernière coupe est réalisée en automne 4 à 6 semaines avant la date d'apparition probable de la première gelée, ce qui perturbe la reconstitution de réserves organiques essentielles pour passer l'hiver et pour la reprise de croissance printanière (Dhont *et al.*, 2002).

## **I-B- Physiologie et croissance du colza**

### **I-B-1- Cycle de développement**

Succédant généralement à une céréale, le colza d'hiver est semé fin août-début septembre. C'est au stade rosette présentant au moins 8 feuilles et un diamètre au collet de 8 mm qu'il est le plus résistant au froid. Il peut alors supporter des températures de  $-20^{\circ}\text{C}$  (Merrien et Pouzet, 1988 ; Diepenbrock, 2000). Une implantation optimale correspond à 40 à 60 pieds par  $\text{m}^2$  à la sortie de l'hiver, soit une quantité de semences nécessaire comprise entre 2 et 4  $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ . En automne, le temps qui sépare le semis de la levée varie en fonction de la température du sol, de son degré d'humidité et de la situation de la graine dans le sol. Il est d'environ 150 degrés jours lorsque l'humidité n'est pas un facteur limitant.

Le cycle du colza peut être divisé en 7 étapes (Figure I-2): germination/levée, production de feuilles, extension de la hampe florale, développement des bourgeons, floraison, développement des siliques et formation des graines (Sylvester-Bradley et Makepeace, 1984).



**Figure I-2 :** Quelques stades repères du colza (d'après documentation CETIOM).

A la levée, le colza étale d'abord ses deux cotylédons (germination épigée). La plante développe ensuite une vingtaine de feuilles qui forment une rosette avant l'hiver (Figure I-2). Dans le même temps, elle élabore un système racinaire en pivot, où elle accumule des réserves qui seront utilisées lors de son développement ultérieur. La fin de cette période, qui coïncide avec la fin de l'automne, est marquée par un ralentissement progressif de la croissance. Le zéro végétatif du colza étant de 4°C, la croissance est presque stoppée pendant la période hivernale au cours de laquelle se produit l'initiation florale sous dépendance de plusieurs facteurs externes (héméroperiode, température) et internes (âge et/ou état de croissance et/ou de développement) agissant en interaction. La durée minimale nécessaire de vernalisation est d'autant plus faible que la température est basse, que l'héméroperiode est longue et que les plantes sont plus âgées (Leterme, 1988). Autrement dit, en conditions de plein champ, l'initiation florale est le résultat d'interaction entre l'état de développement de la plante et la quantité de froid reçu (Tittonel, 1988). L'initiation florale a généralement lieu entre début novembre et mi-décembre (pour un semis en septembre). Elle divise la vie de la plante en deux stades : le stade végétatif et le stade reproducteur.

Une température inférieure à 10°C pendant une quarantaine de jours est nécessaire au cours de la période hivernale pour que la plante puisse fleurir. La croissance reprend quand les températures deviennent plus douces (lorsque la température journalière atteint ou dépasse régulièrement 5°C). Cependant, la "reprise au printemps" dépend beaucoup plus de la date du semis que de la température (Tittonel *et al.*, 1988). Elle se caractérise par une augmentation importante de la surface foliaire qui se prolonge jusqu'au début de la floraison. Parallèlement, la hampe commence à s'allonger (montaison) puis, émet un certain nombre de ramifications (Figure I-2). La montaison est corrélée avec un stade précis de développement de la fleur (Tittonel, 1988). Très échelonnée, la floraison dure de 4 à 6 semaines : elle commence par l'inflorescence principale, suivie par les ramifications axillaires de rangs de plus en plus élevés (Tittonel *et al.*, 1988). Le développement de la fleur est favorisé par les jours longs. La fécondation, essentiellement autogame (autofécondation) donne naissance à une silique dont la maturation est acquise en 6 ou 7 semaines. A maturité, le moindre choc peut provoquer la déhiscence de la silique et la libération des graines. La récolte intervient lorsque le taux d'humidité des graines descend au-dessous de 15 % (graines noires).

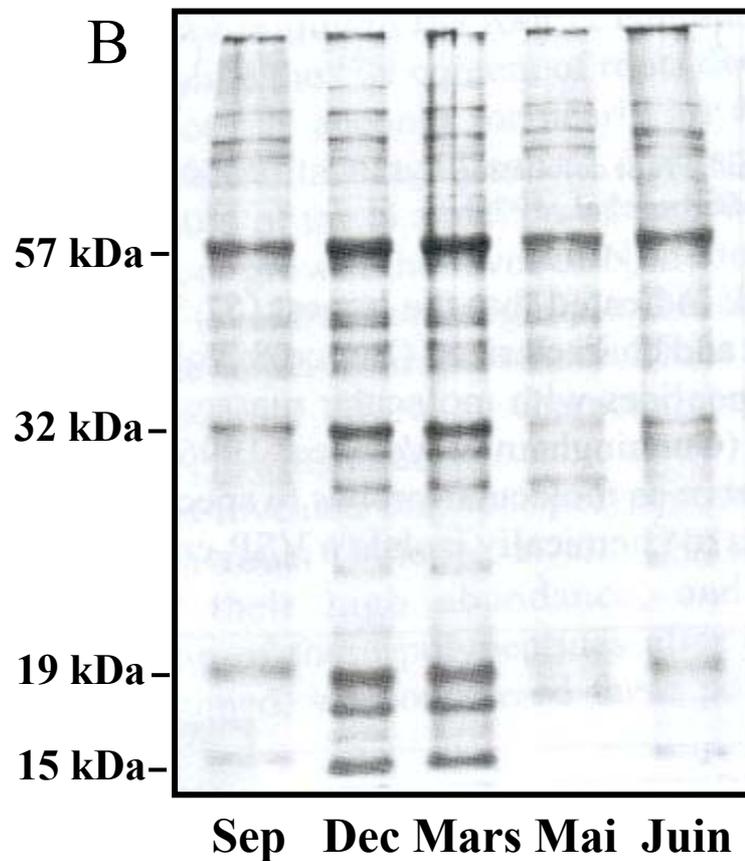
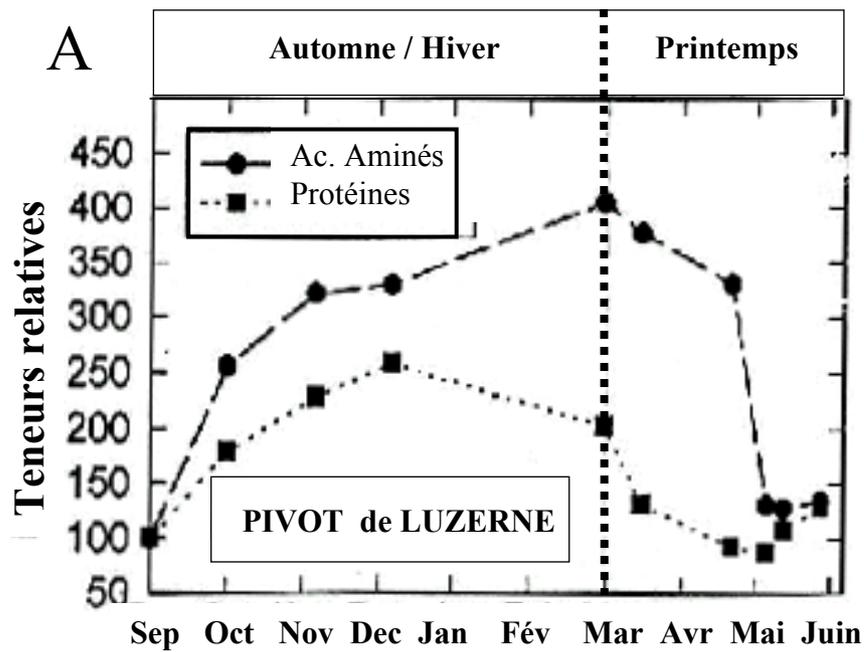
### **I-B-2- Fertilisation azotée et rendement**

Les besoins en azote du colza sont de 6 à 7 kg.q<sup>-1</sup> de graines. Un apport d'engrais azoté est nécessaire pour satisfaire les besoins importants de la plante au moment de la montaison. La quantité d'azote à fournir est calculée en fonction de l'état du peuplement (densité, vigueur), du reliquat de sortie d'hiver du sol (azote disponible dans le sol en tenant compte des prélèvements

de la plante durant l'hiver), de l'azote déjà absorbé par la plante et de la minéralisation de printemps. Elle est fractionnée en 2 apports : l'un effectué début février pour faciliter la reprise (de 30 à 50 % de la dose totale), l'autre au stade "boutons accolés". Pour un rendement compris entre 30 et 35 q.ha<sup>-1</sup>, le minimum requis est de 120 à 150 kg d'N.ha<sup>-1</sup> alors qu'en pratique, les apports peuvent atteindre 180 kg d'N.ha<sup>-1</sup> en moyenne.

L'accumulation de matière sèche (MS) chez le colza est fonction de trois déterminants agronomiques importants : la pré-culture (orge, pois), le type de fertilisant azoté (minéral ou organique) et le niveau d'apport azoté (Rathke, 2000). Le rendement en MS totale est la résultante du taux de croissance et de la durée de la période de croissance. Une analyse quantitative de la formation des siliques confirme la relation linéaire entre la production cumulée de MS jusqu'à la floraison et la densité de siliques. Ainsi, la croissance avant l'initiation florale influence le nombre potentiel de siliques selon le nombre de feuilles qui lui-même détermine le nombre de sites potentiels de bourgeons floraux (Mendham et Scott, 1975). Un meilleur indice de récolte (= % MS graine /MS totale x 100) correspond à un meilleur rendement en graines. Le rendement en graines est le produit du nombre de graines (qui peut être décomposé en nombre de siliques x nombre de graines par silique) par le poids d'une graine (Tribloi-Blondel, 1988).

La date de l'initiation florale peut influencer la formation des siliques et le nombre de graines par silique (Tayo et Morgan, 1979). Mais si le nombre potentiel de siliques dépend largement de la floraison, c'est la disponibilité en assimilats avant et pendant la floraison, qui détermine la densité finale de siliques (Habekotté, 1993). Par exemple, la remobilisation de réserves carbonées accumulées préalablement dans les racines, la hampe florale, les feuilles et les enveloppes des siliques peut contribuer au remplissage des graines pour 12 à 17,5 % du rendement final (Habekotté, 1993). Les feuilles semblent particulièrement déterminantes pour le nombre de siliques et de graines. Le processus le plus limitant pour la photosynthèse démarre après le début de la floraison quand le vieillissement et la chute des feuilles s'accélèrent par l'effet d'ombrage des fleurs puis des siliques (qui sont capables d'intercepter la lumière tout en présentant une assimilation croissante). Un déséquilibre s'instaure alors entre la fourniture d'assimilats par les feuilles (organes source) et le besoin en assimilats des fleurs et siliques (organes puits). Ceci se manifeste par une diminution importante de l'assimilation photosynthétique nette au cours de la floraison jusqu'à ce que les siliques constituent des surfaces photosynthétiquement actives pour leur développement (Gabrielle *et al.*, 1998 ; Tribloi-Blondel, 1988). Un certain nombre de travaux complémentaires qui seront détaillés ultérieurement, montre par ailleurs, que la remobilisation de molécules azotées des tissus végétatifs s'avère déterminante pour le remplissage en azote des tissus reproducteurs.



**Figure I-3** : **A**- Evolution des teneurs relatives en acides aminés et en protéines solubles du pivot de la luzerne au cours de l'année. Les données sont exprimées par rapport à la valeur de Septembre pour lequel le chiffre 100 est attribué (d'après Li *et al.*, 1996). **B**- Analyse SDS-PAGE des protéines solubles du pivot de luzerne au cours de l'année. La masse moléculaire des VSP est précisée sur la gauche du gel (d'après Hendershot et Volenec, 1993a).

## **II- IMPORTANCE DES RESERVES AZOTEES ET MISE EN EVIDENCE DES PROTEINES DE RESERVE DES TISSUS VEGETATIFS (VSP : VEGETATIVE STORAGE PROTEINS)**

Que ce soit pour la formation des tissus reproducteurs chez le colza ou la croissance printanière foliaire au printemps ou après coupe chez la luzerne, l'importance de la mobilisation de réserves organiques préalablement accumulées au sein d'organes végétatifs a été mise en évidence par de récentes études. Le chapitre suivant fait état des connaissances concernant la contribution de ces réserves azotées au développement des plantes.

### **II-A- Utilisation des réserves azotées et caractérisation des VSP chez la luzerne**

#### **II-A-1- Importance des réserves azotées pour la croissance printanière**

Contrairement à une idée communément et longtemps admise, plusieurs études portant sur la fréquence des récoltes de luzerne en automne, ne montrent aucune corrélation entre le niveau d'accumulation en amidon et en sucres solubles du pivot et la tolérance au stress ou le potentiel de repousse au printemps (Volenc *et al.*, 1996). Ainsi, aucun lien de cause à effet n'a pu être mis en évidence de façon corrélatrice entre une forte teneur en réserves glucidiques dans les tissus pérennes et la tolérance à la défoliation, la tolérance au froid ou le potentiel de croissance même si des travaux plus récents (Dhont *et al.*, 2002) suggèrent que la quantité totale de réserves carbonées, plus que la teneur, pourrait constituer un meilleur indicateur du potentiel de repousse. Dès lors, les interrogations concernant les mécanismes physiologiques et biochimiques contrôlant la croissance et la persistance des légumineuses fourragères ont conduit à s'intéresser à d'autres composants, notamment aux pools azotés.

Parmi les réserves azotées, les teneurs en protéines solubles et en acides aminés dans le pivot de la luzerne augmentent fortement au cours de la phase automno-hivernale (Li *et al.*, 1996 ; Figure I-3). Par rapport au mois de Septembre, les teneurs relatives augmentent d'un facteur 2 et 4 à la fin du mois de Décembre, respectivement pour les protéines solubles et les acides aminés (Figure I-3A). Au printemps, lors de la réactivation des méristèmes, on observe une forte mobilisation des 2 types de composés azotés (Figure I-3A), qui retrouvent au mois de Mai un niveau équivalent à celui déterminé en Septembre. Au cours de la période de redémarrage de croissance printanière, Hendershot et Volenc (1993a) ont observé parallèlement une activité protéasique accrue. Les acides aminés et les protéines solubles des organes racinaires présentent donc un cycle saisonnier de stockage /dégradation éventuelle et remobilisation. Cette accumulation hivernale a été démontrée à plusieurs reprises pour les acides aminés (Morot-

Gaudry *et al.*, 1987 ; Barber *et al.*, 1996 ; Dhont *et al.*, 2003) et les protéines solubles (Dhont *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 1996) des organes racinaires de la luzerne.

Chez les espèces fourragères, et plus particulièrement chez la luzerne, les acides aminés sont considérés comme étant le pool d'azote le plus rapidement mobilisable, tandis que les protéines solubles forment le pool d'azote quantitativement le plus important (Ourry *et al.*, 1994). Grâce à une séparation des protéines solubles par SDS-PAGE (Figure I-3B), l'évolution "qualitative" du contenu en protéines solubles du pivot de la luzerne a permis de constater que 3 protéines de 32, 19 et 15 kDa s'accumulent fortement au cours de la phase automno-hivernale (Hendershot et Volenec, 1993a ; Li *et al.*, 1996). Ces 3 polypeptides restent abondants pendant la période de dormance hivernale puis leurs abondances relatives chutent fortement au moment du redémarrage de la croissance au printemps (Figure I-3B). Par rapport aux autres protéines, ces polypeptides présentent donc un cycle saisonnier d'accumulation / mobilisation très marqué.

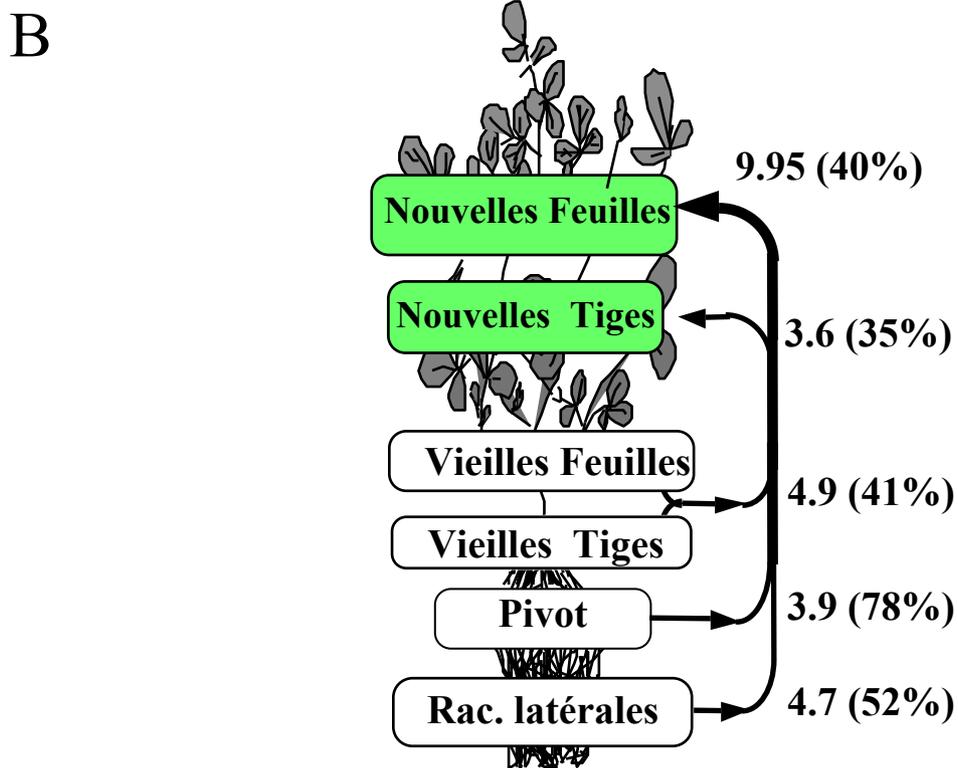
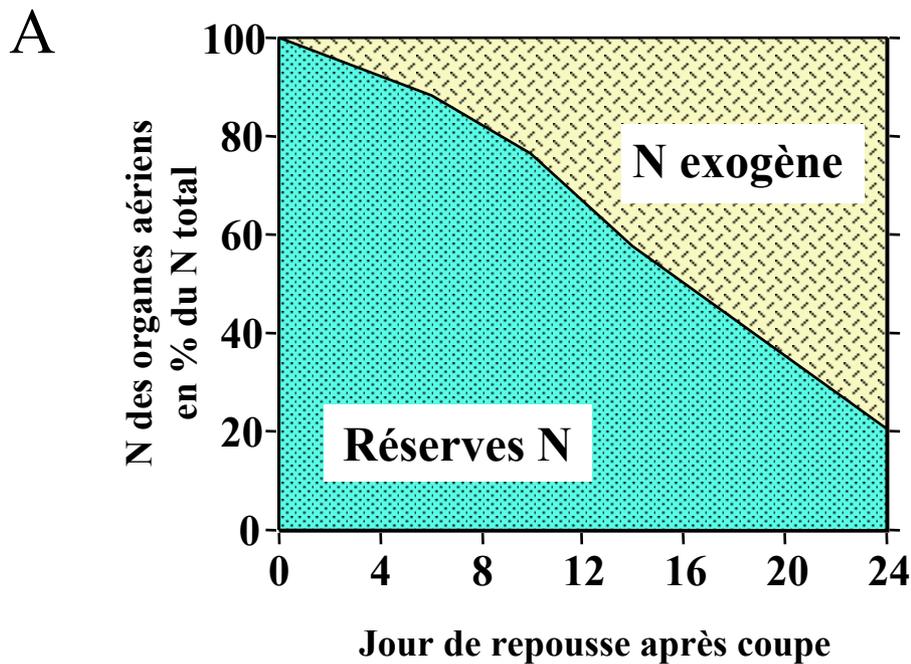
Comme nous allons le voir dans le chapitre suivant, cette caractéristique (cycle préférentiel d'accumulation / dégradation) a également été observée pour ces protéines au cours d'une repousse après coupe des tissus aériens.

#### **II-A-2- Contribution des réserves azotées à la repousse après coupe**

Chez la luzerne, comme chez d'autres légumineuses fourragères, il a été montré que la défoliation provoque:

- la chute immédiate de l'activité photosynthétique,
- une forte réduction du flux transpiratoire,
- une diminution rapide de l'absorption des éléments nutritifs notamment azotés, et de la fixation symbiotique.

Ainsi, Davidson *et al.* (1990) et Kim *et al.* (1991) rapportent que le début de repousse est caractérisé par une faible absorption d'azote chez les légumineuses nodulées ou non. En effet, elle est réduite de près de 35 % après suppression des parties aériennes (Kim *et al.*, 1991). L'activité fixatrice d' $N_2$  chez les légumineuses fourragères est également affectée par la défoliation (Vance *et al.*, 1979 ; Ryle *et al.*, 1986 ; Gordon *et al.*, 1986 ; Culvenor *et al.*, 1989). Chez la luzerne, elle chute de 88 % dans les 24 premières heures qui suivent la coupe et se maintient à ce faible niveau pendant 14 jours (Vance *et al.*, 1979 ; Vance et Heichel 1981 ; Kim *et al.* 1993a, b). Chez le Trèfle blanc (*Trifolium repens L.*), Ryle *et al.* (1986) ont montré une brusque réduction de la respiration dans les nodosités associée au déclin de l'activité nitrogénase due à la défoliation. Ceci entraîne une modification de la perméabilité des nodosités à l'oxygène moléculaire, qui induirait une augmentation de la pression partielle en  $O_2$  (Denison *et al.*, 1992 ; Hartwig *et al.*, 1994), aboutissant à une inactivation de la nitrogénase.

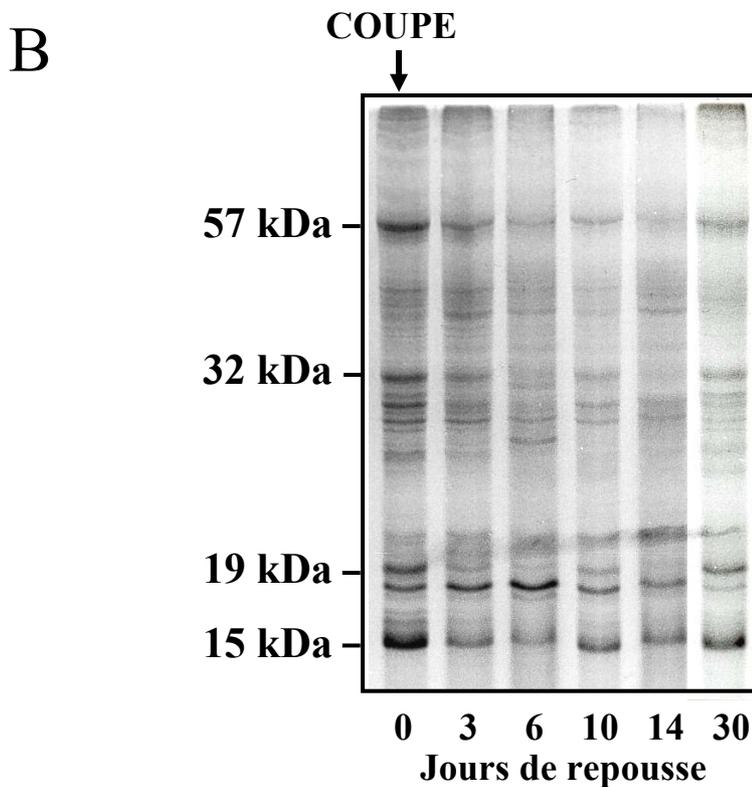
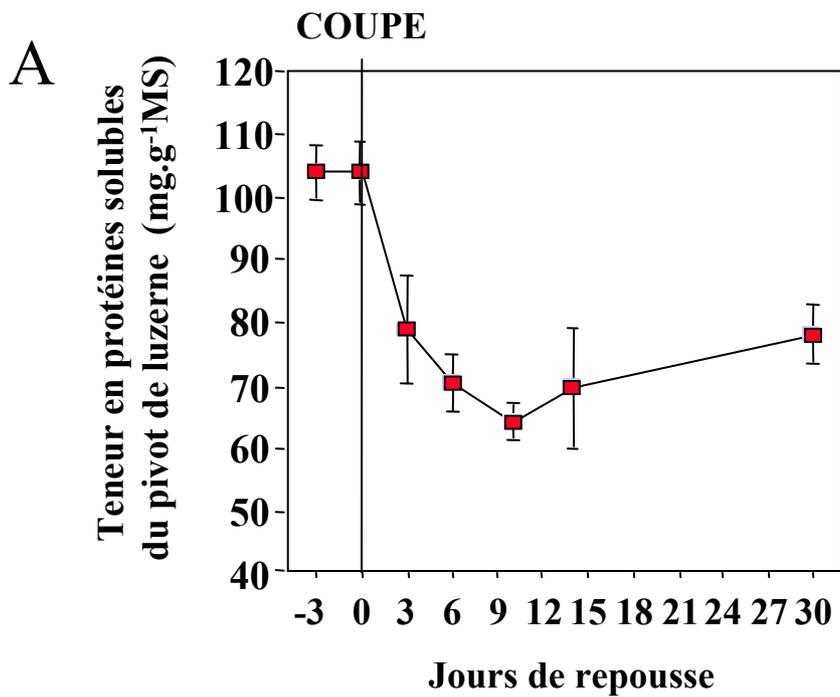


**Figure I-4 :** **A-** Proportion de l'azote total des parties aériennes en repousse issu des réserves azotées (Réserve N) ou de l'azote exogène (N exogène : provenant de la fixation symbiotique et/ou de l'absorption), exprimée en % de l'azote total aérien, au cours d'une repousse de 24 jours après coupe chez la luzerne. **B-** Flux d'azote (mg N. plante<sup>-1</sup> provenant des réserves stockées dans les organes laissés en place par la coupe (Organe sources : pivot, racines latérales, vieilles feuilles et tiges) vers les tissus en repousse chez la luzerne. Les chiffres entre parenthèses correspondent aux flux d'azote issus des réserves en pourcentage du contenu azoté total d'un organe puits ou d'un organe source, c'est-à-dire la contribution des réserves azotées à l'azote total d'un organe puits (case verte) et la proportion de l'azote mobilisé par un organe source (case blanche). D'après Ourry *et al.* (1994).

La mobilisation des composés carbonés et azotés, préalablement mis en réserve dans les organes laissés en place par la coupe, est par conséquent nécessaire pour assurer le début de la repousse et la reprise de l'absorption et/ou de la fixation symbiotique d'azote.

Une expérimentation basée sur un double marquage  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  des réserves organiques réalisé préalablement à la coupe chez la luzerne a permis de préciser le niveau de contribution des deux types de réserves (C et N) dans la repousse des nouveaux organes aériens (Avice *et al.*, 1996b). La fourniture de carbone issue de l'hydrolyse de l'amidon joue essentiellement un rôle énergétique *via* les processus respiratoires (Ta *et al.*, 1990 ; Avice *et al.*, 1996b). En effet, la plus grande proportion du carbone mis en réserve (40 %) est utilisée pour la respiration racinaire après 8 jours de repousse. Les réserves glucidiques sont donc utilisées comme source énergétique (fourniture d'ATP et de pouvoir réducteur) nécessaire aux mécanismes de biosynthèse et d'hydrolyse ainsi qu'au maintien de l'activité respiratoire des organes laissés en place par la coupe. Pendant les 10 premiers jours de repousse, la plus grande part de l'azote exporté dans les nouveaux tissus aériens est issue des réserves azotées (Figure I-4-A) puisqu'elles représentent 80 % de l'azote retrouvé dans les organes néoformés après 8 jours de repousse (Kim *et al.*, 1993a ; Ourry *et al.*, 1994 ; Avice *et al.*, 1996b). Au delà d'une semaine de repousse, l'assimilation d'azote atmosphérique et d'azote minéral redevenant significative (Gordon et Kessler, 1990 ; Avice *et al.*, 1996b), la contribution des réserves azotées à la fourniture d'azote aux nouveaux tissus devient plus faible. Ainsi, au bout de 24 jours, les réserves azotées ne contribuent plus que pour 20 % au contenu en azote des nouveaux organes aériens (Figure I-4-A). D'autre part, 20 à 50 % du  $^{13}\text{C}$  des feuilles et des tiges en repousse proviennent du transfert des molécules azotées et non de l'hydrolyse des polysaccharides de réserve (Avice *et al.*, 1996a). L'ensemble de ces résultats montre donc que les réserves azotées sont mobilisées pour fournir non seulement l'azote mais également une part non négligeable du carbone nécessaires à l'élaboration des nouveaux organes (Avice *et al.*, 2001b).

Les flux d'azote remobilisé vers les nouvelles feuilles et les nouvelles tiges (organes puits) après 24 jours de repousse (Figure I-4-B, Ourry *et al.*, 1994) permettent de préciser le niveau de contribution des différents organes source (feuilles et tiges des chaumes, pivot ou racines latérales). Avec un taux de mobilisation de l'azote endogène de 78 %, le pivot constitue l'organe source majeur et ses réserves azotées sont principalement allouées vers les feuilles en croissance. De plus, il s'avère que les composés azotés mobilisés vers les tissus aériens sont issus essentiellement de la dégradation des protéines solubles stockées dans le pivot (Figure I-5A). En effet, l'étude de l'évolution de la teneur en protéines solubles du pivot montre une protéolyse apparente d'environ 40 % lors des premiers jours de repousse (Figure I-5A).



**Figure I-5** : **A-** Evolution de la teneur en protéines solubles du pivot de luzerne au cours d'une repousse de 30 jours après coupe. **B-** Profil électrophorétique (SDS-PAGE) des protéines hydrosolubles du pivot de luzerne au cours de la repousse après défoliation (0, 3, 6, 10, 14 et 30 jours). 150 µg de protéines solubles sont déposés par puits. Les masses moléculaires des VSP sont indiquées sur la gauche. 0= jour de coupe (d'après Avice *et al.*, 1996a).

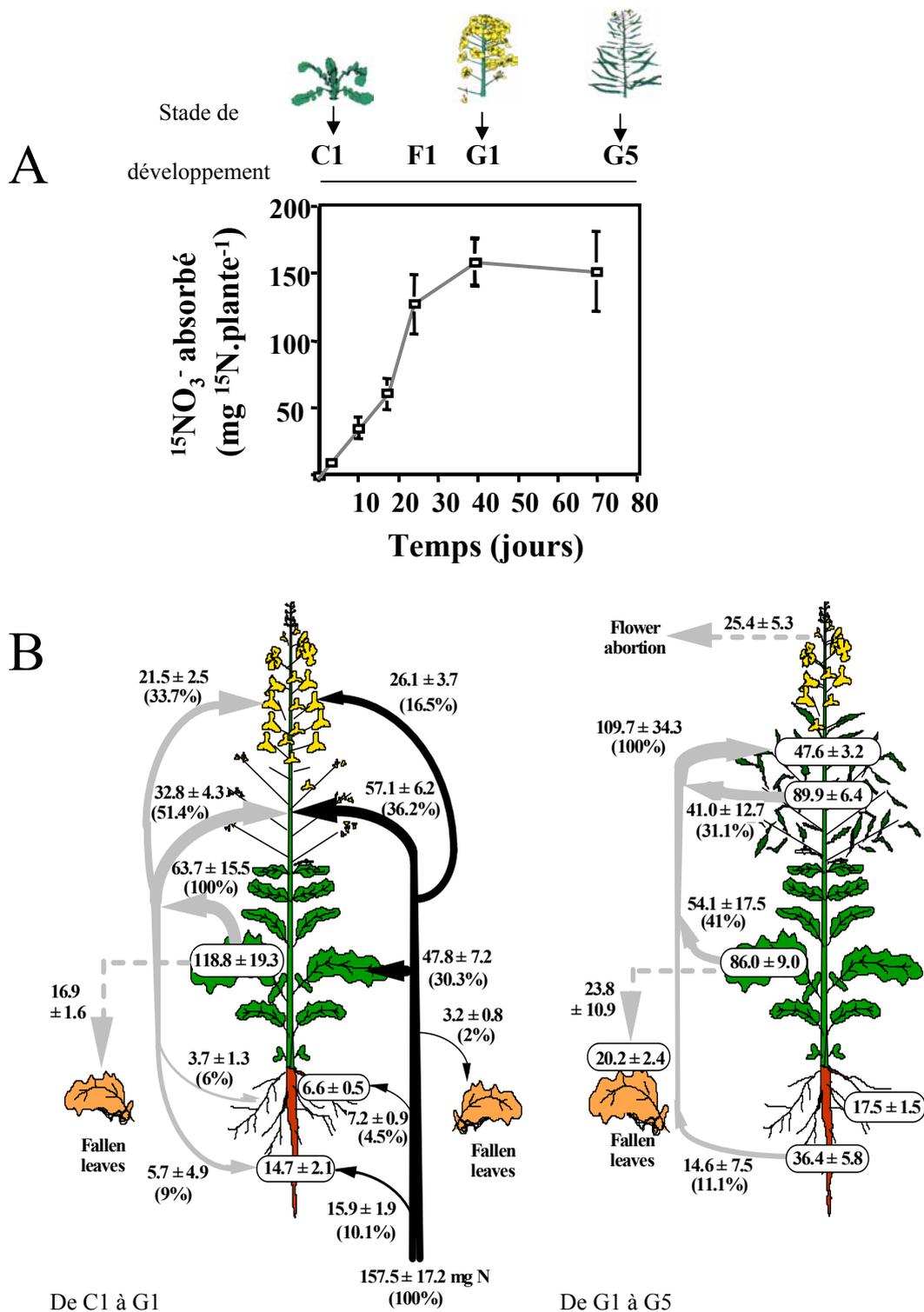
L'évolution des profils électrophorétiques des protéines solubles du pivot par SDS-PAGE (Figure I-5B) au cours d'un cycle coupe / repousse montre que 3 polypeptides de 32, 19 et 15 kDa sont très abondants le jour de coupe, constituant jusqu'à 40 % des protéines solubles totales du pivot (Figure I-5B). Ils présentent ensuite un taux d'hydrolyse élevé (60 à 80 % de mobilisation au 6<sup>ème</sup> jour de repousse, Figure I-5B), qui est très supérieur au taux de mobilisation de 40 % observé pour l'ensemble des protéines solubles (Figure I-5A). Ensuite, ces 3 protéines sont à nouveau accumulées en fin de repousse (Figure I-5B). Des études récentes ont permis de mettre en évidence qu'une autre protéine de 57 kDa (Figure I-3A et I-5B) avait un rôle très important dans la mise en réserve d'azote chez la luzerne (Gana *et al.*, 1998). Cette protéine de 57 kDa est une  $\beta$ -amylase qui peut être présente à des concentrations élevées dans le pivot de la luzerne : elle constitue jusqu'à 8 % des protéines solubles (Boyce et Volenec, 1992). Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -1,4-glycosidiques des extrémités non réduites des molécules d'amidon en libérant le maltose et en donnant des  $\beta$ -dextrines limitées (Thomas *et al.*, 1971). Après une défoliation et comparativement à une plante laissée intacte, les teneurs en amidon chutent de façon importante, alors que paradoxalement l'activité d'hydrolyse de la  $\beta$ -amylase est significativement réduite à la suite d'une coupe (Gana *et al.*, 1998). Dans le même temps, le niveau d'expression du transcrit codant la  $\beta$ -amylase chute au cours des 12 premiers jours après la défoliation et devient plus important après 24 jours.

Ainsi, ces protéines de 15, 19, 32 et 57 kDa présentent des variations saisonnières (Figure I-3-B) : elles s'accumulent massivement en automne et au début de l'hiver et présentent un fort taux d'hydrolyse à la reprise de croissance au printemps (Hendershot et Volenec, 1993a ; Gana *et al.*, 1998). D'autre part, elles présentent également un cycle préférentiel de mobilisation / accumulation lors de la repousse après coupe (Hendershot et Volenec, 1993b ; Avice *et al.*, 1996a, Figure I-5B). Elles possèdent donc les caractéristiques permettant de les classer parmi les VSP (Vegetative Storage Proteins pour protéines de réserve des tissus végétatifs) précédemment décrites par Cyr et Bewley (1990a, b) et Staswick (1988, 1994).

## **II-B- Utilisation des réserves azotées et caractérisation d'une VSP chez le colza**

### **II-B-1- Bilan environnemental pour l'azote chez le colza**

De par sa forte capacité à absorber l'azote minéral à l'automne et au début de l'hiver, le colza peut constituer un "piège à nitrates" permettant de réduire les problèmes de lixiviation de l'azote. Cependant, sa culture présente également des risques environnementaux. D'une part, il est caractérisé par une faible efficacité de transfert des fertilisants azotés vers les tissus récoltés : seulement 50 % de l'azote apporté par fertilisation se retrouve dans les graines (Schjoerring *et al.*, 1995). De plus, une perte d'azote (pouvant atteindre plus de 100 kg.ha<sup>-1</sup>) est occasionnée par la



**Figure I-6** : **A-** Absorption cumulée d'azote nitrique (exprimée en mg de N-NO<sub>3</sub>-plante<sup>-1</sup>) estimée par marquage au <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> pendant 70 jours en conditions d'hydroponie chez le colza. Les stades indiqués (C1 à G5) correspondent à ceux défini par le CETIOM (Figure I-2). C1 : Montaison, F1 : Début floraison, G1 : Début formation des siliques, G5 : Graines colorées. **B-** Bilan des transferts d'N endogène (flèches de gauche) et exogène (flèches de droite) en mg N. plante<sup>-1</sup> entre les stades C1 et G1 (schéma de gauche) et des transferts d'N total (endogène et exogène) en mg N. plante<sup>-1</sup> entre les stades G1 et G5 (schéma de droite) au sein de la plante. Les chiffres entre parenthèses indiquent la répartition entre organes en % de l'azote endogène remobilisé à partir des feuilles vertes (à gauche, schéma de gauche) ou en % de l'azote absorbé (à droite, schéma de gauche) ou la contribution de chaque organe au remplissage en azote total des siliques et des graines (schéma de droite). La quantité totale d'azote présent au sein de chaque organe au début de l'expérimentation (stade C1, schéma de gauche) et au stade G1 (schéma de droite) est donnée dans les boîtes (d'après Rossato *et al.*, 2001).

minéralisation des feuilles mortes tombées au sol à l'automne et en hiver (Dejoux *et al.*, 2000) alors que la teneur en azote des feuilles reste élevée.

La faible efficacité de valorisation de l'azote absorbé, alloué aux tissus récoltables serait due à une limitation de la force puits plus qu'à une faible disponibilité en azote (Rossato *et al.*, 2001). Ainsi, des études réalisées en conditions contrôlées et permettant une meilleure compréhension de la mise en réserve d'azote et de son recyclage au sein de la plante ont été entreprises afin d'envisager une meilleure mobilisation de l'azote foliaire en augmentant le stockage dans des organes puits alternatifs.

### **II-B-2- Absorption d'azote minéral et bilan des flux d'azote endogène et exogène entre les stades C1 et G5**

Une expérimentation récemment menée par Rossato *et al.* (2001) reposant sur l'utilisation d'un marquage continu à l'azote  $^{15}\text{N}$  a permis de suivre l'absorption cumulée de  $^{15}\text{NO}_3^-$  pendant 70 jours en conditions contrôlées (Figure I-6A) depuis la montaison (stade C1) jusqu'à la maturation des graines (G5). Elle est forte jusqu'au stade G1 (début de formation des siliques) tout en présentant un ralentissement au stade F1 (début de floraison). Au stade G1, elle atteint un plateau montrant qu'elle n'est plus significative jusqu'à la maturation des graines (stade G5).

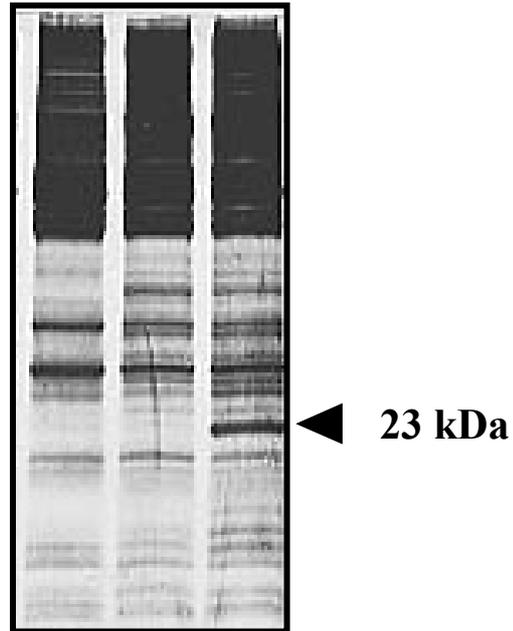
Ce résultat préliminaire suggère donc que la formation des siliques et en particulier, leur remplissage en azote, dépendent majoritairement d'un recyclage à partir des tissus végétatifs.

D'autre part, l'utilisation du traceur isotopique  $^{15}\text{N}$  a également permis de quantifier la contribution de l'azote endogène et exogène à la croissance et au développement du colza, du stade C1 (montaison) au stade G5 (graines colorées). Grâce à ces données, deux phases ont été distinguées (Figure I-6B):

- 1<sup>ère</sup> phase : avant le remplissage des graines, l'azote minéral absorbé (N exogène) est principalement alloué à la hampe (36 %), aux feuilles (30 %), aux inflorescences (16,5 %) et au pivot (10 %). Une forte quantité d'azote endogène des feuilles sénescentes est remobilisée principalement au profit de la hampe (51 %), des inflorescences (33 %) et du pivot (9 %), qui constituent par ordre décroissant les organes puits les plus importants pour l'azote mobilisé à partir des feuilles (Figure I-6B).
- 2<sup>ème</sup> phase : à partir du stade G1, on observe une phase de mobilisation de l'azote accumulé dans la plante entière pour permettre le remplissage des siliques et des graines (Figure I-6B) alors que les capacités d'absorption sont fortement limitées (Figure I-6A). La hampe florale, les inflorescences et le pivot voient alors leur statut passer de puits à source au profit des siliques devenues le seul puits. Ainsi, 48 % de l'azote circulant dans la plante sont alloués aux siliques, et la plus grande partie provient directement du recyclage de l'azote à partir des

Stade du colza :

C1 D1 G1



**Figure I-7** : Evolution du profil électrophorétique (SDS-PAGE) des protéines solubles du pivot de colza de la montaison (stade C1) jusqu'au début de la formation des siliques (stade G1). 3,4  $\mu\text{g}$  de protéines solubles sont déposés par puits. La flèche désigne la protéine de 23 kDa (d'après Rossato *et al.*, 2001).

autres organes (à l'exception des racines secondaires), principalement des feuilles (Rossato *et al.*, 2001) ou de la hampe (Schjoerring *et al.*, 1995 ; Dreccer *et al.*, 2000).

Ces résultats indiquent que le remplissage des graines intervenant entre les stades G1 et G5 dépend fortement de la remobilisation de composés azotés préalablement accumulés dans les organes végétatifs (Diepenbrock, 2000 ; Rossato *et al.*, 2001). Ainsi, environ 70 % de l'azote présent dans la hampe florale et les enveloppes des siliques à la mi-floraison sont mobilisés. A la récolte, 10 % de l'azote total retrouvé dans les parties aériennes est située dans la hampe florale et les enveloppes des siliques, le reste se trouvant dans les graines (Schjoerring *et al.*, 1995).

### **II-B-3- Identification d'une VSP au cours du passage de la phase végétative à la phase reproductrice du colza**

Nous venons de voir que pendant le remplissage des graines, l'absorption d'azote est trop faible pour faire face à la demande (Rossato *et al.*, 2001). Lors du passage du stade végétatif au stade reproducteur, il y a donc un transfert des ressources par recyclage de l'azote des tissus végétatifs vers les organes reproducteurs en développement. La formation des siliques et le développement des graines sont ainsi largement dépendants de la mobilisation d'assimilats précédemment mis en réserve (Diepenbrock, 2000).

L'analyse des profils électrophorétiques (SDS-PAGE) a révélé qu'une protéine de 23 kDa s'accumulait principalement dans le pivot jusqu'à la fin de la floraison chez la lignée pure Capitot en conditions contrôlées (stade G1, Figure I-7) ou de plein champ (Rossato *et al.*, 2001 ; Rossato, 2000). Quand les plantes sont cultivées à plus basse température (15 jours, 4°C), la date de floraison est différée de 15 jours par rapport au témoin cultivé constamment à 20°C ainsi que l'accumulation de la VSP. Cette protéine est remobilisée lors du développement des siliques et du remplissage des graines au moment où le pivot passe du statut d'organe puits au statut d'organe source (Figure I-6B). Ainsi, les produits d'hydrolyse de cette protéine pourraient contribuer au remplissage en azote des siliques alors que l'absorption se trouve réduite (Rossato *et al.*, 2001). Par ailleurs, la synthèse de cette protéine fait suite au recyclage interne d'azote résultant d'un processus de sénescence foliaire. Grâce à l'utilisation d'anticorps anti-23 kDa, Rossato *et al.* (2002b) ont également montré que cette protéine pouvait s'accumuler dans la hampe florale (23 kDa) et qu'une protéine homologue était détectée dans les feuilles et les inflorescences (24 kDa). D'autre part, elle peut s'accumuler également chez d'autres espèces de la famille des Brassicacées telles que le chou ou le radis (*Raphanus sativus*) mais ne s'exprime pas chez l'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*), ni chez la moutarde blanche (*Sinapis alba*) ou la navette (Rossato *et al.*, soumise, 2003).

**Tableau I-I:** Liste non exhaustive des protéines de réserve des organes végétatifs (VSP) chez les espèces herbacées et ligneuses : caractérisation, localisation et fonctions métaboliques.

Espèce	Nom commun	Localisation tissulaire principale	Masse moléculaire (kDa)	Signaux inducteurs	Autre fonction	Références
<i>Glycine max</i>	soja	feuilles	27, 29	MeJA, blessure, fertilisation N, élimination des organes puits, sucres solubles, stress hydrique	phosphatase acide	Wittenbach, 1983 ; Staswick, 1989, 1990 De Wald <i>et al.</i> , 1994 ; Mason et Mullet, 1990
		feuilles	94	élimination des organes puits,	lipoxygénase	Tranbarger <i>et al.</i> , 1991 ; Stephenson <i>et al.</i> , 1998
<i>Arabidopsis thaliana</i>	arabette des dames	fleurs, boutons floraux	29, 30	MeJA, blessure, phosphate	phosphatase acide	Berger <i>et al.</i> , 1995
<i>Solanum tuberosum</i>	pomme de terre	tubercule	41 (patatine)	MeJA, ABA, jour court	lipid acyl hydrolase β-1,3 glucanase	Paiva <i>et al.</i> , 1983 ; Strickland <i>et al.</i> , 1995 Tonón <i>et al.</i> , 2001
<i>Helianthus tuberosum</i>	topinambour	tubercule	16, 16.5, 18			Mussigmann and Ledoigt, 1989
<i>Ipomoea batatas</i>	patate douce	racine tubérisée	25 (sporamine)			Li et Oba, 1985,
		feuilles		blessure	inhibiteur de protéase	Yeh <i>et al.</i> , 1997
<i>Euphorbia esula</i>	euphorbe	racines	26			Cyr and Bewley, 1990b
<i>Cichorium intybus</i>	chicorée	racines	18			Cyr and Bewley, 1990a
		racines	17	fertilisation N		Améziane <i>et al.</i> , 1997
<i>Taraxacum officinale</i>	pissenlit	racines	18			Cyr and Bewley, 1990a
		tige, collet			résistance aux pathogènes	Xu <i>et al.</i> , 2000
<i>Medicago sativa</i>	luzerne	pivot	15, 19, 32			Hendershot et Volenec, 1993a, b ; Avice <i>et al.</i> , 1996a
		pivot	57		β-amylase	Gana <i>et al.</i> , 1998
<i>Lotus corniculatus</i>	lotier	pivot	25			Li <i>et al.</i> , 1996
<i>Trifolium repens</i>	trèfle	stolons, racines	17.3	basse température, ABA	résistance aux pathogènes	Corre <i>et al.</i> , 1996 ; Goulas, 2001
<i>Brassica napus</i>	colza	pivot	23	MeJA, ABA		Rossato <i>et al.</i> , 2002a, b
<i>Oxalis tuberosa</i>	oca du Pérou	tubercule	30 (ocatine)		résistance aux pathogènes	Flores <i>et al.</i> , 2002
<i>Vigna radiata</i>	soja vert	hypocotyles	50			Odaira <i>et al.</i> , 1997
<i>Acer saccharum</i>	érable	écorce	16, 24			Wetzel <i>et al.</i> , 1989
<i>Sambucus nigra</i>	sureau	écorce	34.5, 37.5			Greenwood <i>et al.</i> , 1986
<i>Salix x smithinia</i>	saule	écorce	32			Wetzel <i>et al.</i> , 1989
<i>Prunus persica</i>	pêcher	écorce, bois	16, 19			Arora <i>et al.</i> , 1992
<i>Populus sp</i>	peuplier	écorce, bois, racines	32, 36	jour court, basse température, fertilisation N MeJA, GAs, Ca <sup>2+</sup>		Van Cleve et Apel, 1993 Beardmore <i>et al.</i> , 2000 ; Zhu et Coleman, 2001b
<i>Metasequoia sp</i>	séquoia	bois	32, 34			Harms et Sauter, 1991

Le niveau d'accumulation élevé ainsi que le cycle accumulation / mobilisation de cette protéine temporellement cohérent avec la cinétique des flux de remobilisation ont permis d'attribuer un rôle de VSP à cette protéine de 23 kDa selon les critères proposés par Wittenbach (1983) et Staswick (1994).

A la suite de la mise en évidence de VSP chez la luzerne et le colza, le chapitre suivant développera les dernières connaissances relatives à la caractérisation, aux fonctions et à la régulation de l'accumulation des VSP chez les espèces herbacées et ligneuses.

### **III- LES PROTEINES DE RESERVE DES ORGANES VEGETATIFS (VSP = VEGETATIVE STORAGE PROTEIN): Caractérisations, fonctions et régulations**

#### **III-A- Définition et caractérisation**

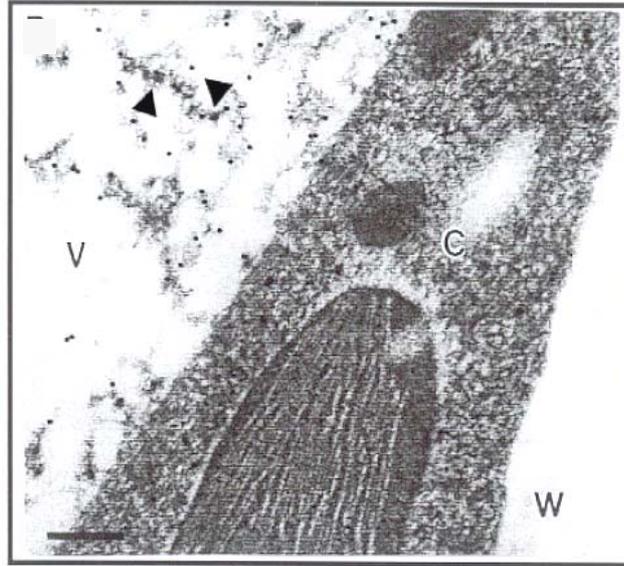
##### **III-A-1- Identification des VSP et définitions classiquement admises**

Bien que les protéines de réserve aient été d'abord décrites dans les graines (SSP pour Seed Storage Protein) pour leur rôle dans la fourniture de l'azote nécessaire aux plantules pour le démarrage de croissance, il apparaît depuis deux décennies que les tissus végétatifs contiennent aussi des protéines spécifiques pouvant avoir un rôle homologue.

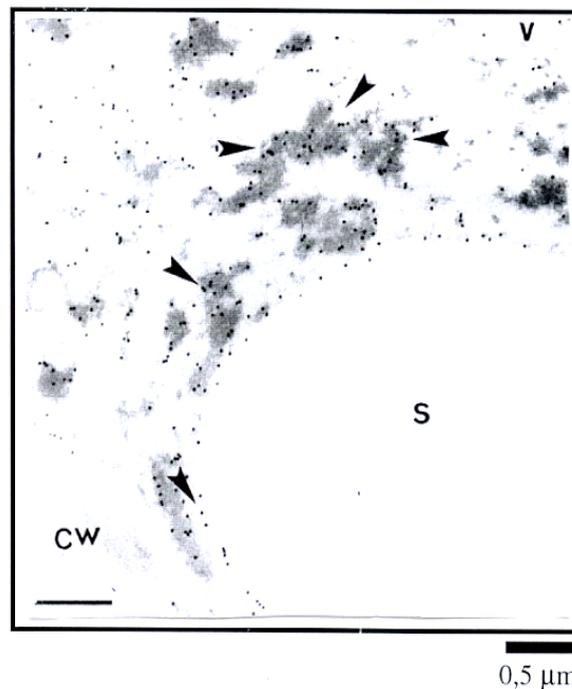
En effet, Wittenbach (1983) puis Staswick (1988) furent les premiers à décrire des VSP s'accumulant transitoirement en grande quantité dans les feuilles, les graines et les tiges de soja (*Glycine max*) avant d'être dégradées pour les besoins nutritionnels des autres organes. Ce terme s'est également appliqué à des protéines préalablement identifiées dans les tubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum*, Paiva *et al.*, 1983) et de patate douce (*Ipomoea batatas*, Li et Oba, 1985) ainsi qu'à de nombreuses autres protéines identifiées dans des organes souterrains (tubercules, racines, pivot et rhizomes) de différentes espèces herbacées ou chez les légumineuses fourragères dans les stolons du trèfle blanc (*Trifolium repens*, Corre *et al.*, 1996) ou le pivot du lotier (*Lotus corniculatus*, Li *et al.*, 1996) (Tableau I-I).

De nombreuses espèces ligneuses présentent également des VSP essentiellement localisées au niveau du parenchyme du xylème ou du phloème (Tableau I-I), tel que chez le peuplier (*Populus deltoides*, Coleman *et al.*, 1991), le sureau (*Sambucus nigra*, Greenwood *et al.*, 1986) ou le pêcher (*Prunus persica*, Arora *et al.*, 1992). Ces protéines sont stockées de façon abondante au cours de l'automne et de l'hiver dans les organes pérennes tels que l'écorce et sont alors nommées BSP pour Bark Storage Protein (protéine de réserve de l'écorce) puis disparaissent à la reprise de croissance au printemps. Plus récemment, des VSP ont été identifiées pour la première fois dans la pulpe et la peau du fruit du bananier (*Musa spp*, Peumans *et al.*, 2002), dans les hypocotyles de

## A feuille du soja



## B pivot de luzerne



**Figure I-8** : **A-** Immunolocalisation en microscopie électronique de la VSP de 94 kDa dans les cellules du mésophylle paraveineux de la feuille de soja (Tranbarger *et al.*, 1991). Le trait horizontal représente 0,25 µM. **B-** Immunolocalisation en microscopie électronique à transmission des VSP (32, 19 et 15 kDa) dans les cellules du parenchyme xylémique du pivot de luzerne âgée de 6 mois (Avice *et al.*, 1996a). La présence de grains d'or colloïdal (voir les flèches noires) révèle la présence de VSP. C= cytoplasme; CW et W= paroi cellulaire; S= amidon; V= vacuole.

soja vert (*Vigna radiata*, Odaira *et al.*, 1997) ou dans les pousses en croissance chez le peuplier (Lawrence *et al.*, 1997).

Selon Staswick en 1994, les critères de caractérisation des VSP étaient les suivants :

- elles sont localisées dans la vacuole au niveau des corps protéiques (petites vacuoles déshydratées spécialisées dans le stockage protéique),
- elles représentent au moins 5 % des protéines totales,
- elles sont stockées pour assurer les besoins nutritionnels requis pour un stade de développement ultérieur,
- elles n'ont pas d'autre fonction métabolique ou structurale.

Ce dernier critère a cependant largement évolué depuis ces dernières années comme nous le développerons ultérieurement.

D'autres caractéristiques peuvent être rapportées, ces protéines doivent également présenter

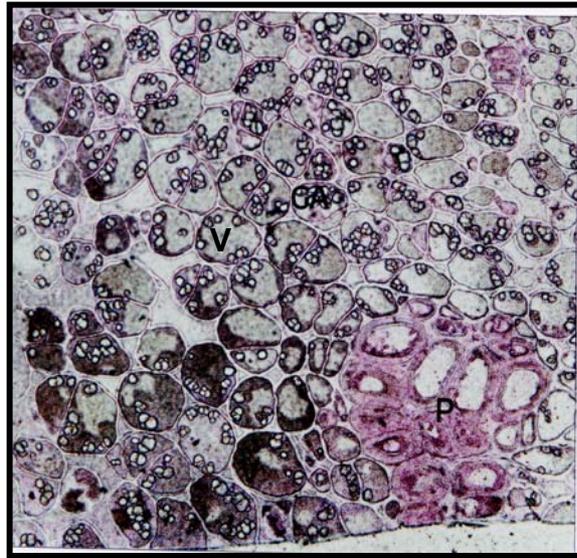
- une forte accumulation et un taux d'hydrolyse élevé par rapport à l'ensemble des protéines hydrosolubles au cours d'un cycle de croissance,
- une localisation tissulaire ou cellulaire spécifique,
- une évolution du cycle accumulation / dégradation parallèle à la mobilisation et à la reconstitution des réserves azotées.

### **III-A-2- Localisation, caractéristiques structurales et biochimiques des VSP**

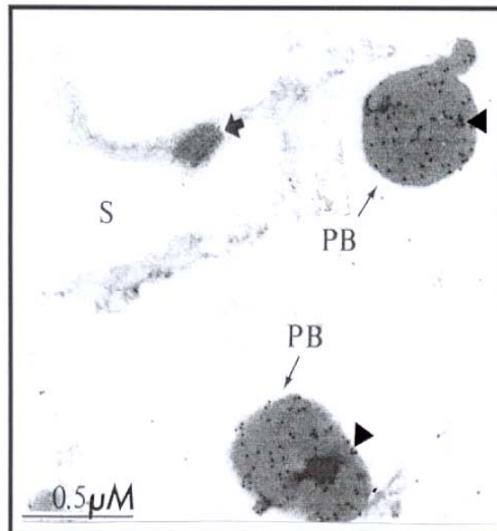
Les VSP sont généralement des homo ou hétérodimères (De Wald *et al.*, 1992). Le poids moléculaire des sous-unités est souvent compris entre 15 et 45 kDa chez les ligneux (Stepien *et al.*, 1994). Elles sont le plus souvent glycosylées sauf celles du trèfle (*Trifolium repens*, Bouchart *et al.*, 1998) et une des VSP (18 kDa) du tubercule de topinambour (*Helianthus tuberosum*, Mussigmann et Ledoigt, 1989).

Des études par immunolocalisation tissulaire montrent que les VSP de la feuille de soja se trouvent dans les cellules du mésophylle paraveineux (Franceschi *et al.*, 1983). A certains stades de développement, elles sont également étroitement associées aux cellules de la gaine périvasculaire (Franceschi *et al.*, 1983) et aux cellules épidermiques foliaires (Staswick, 1990). Au niveau des tiges et des gousses, on les retrouve dans les tissus vasculaires (Huang *et al.*, 1991). Ainsi, elles sont accumulées à proximité du phloème et du xylème. Au niveau subcellulaire, Franceschi *et al.* (1983) et Tranbarger *et al.* (1991) ont précisé par immunolocalisation que ces VSP sont fortement accumulées dans le compartiment vacuolaire sous forme d'agrégats (Figure I-8A). De manière similaire, les VSP du pivot de la luzerne (32, 19 et 15 kDa) sont immunolocalisées principalement dans le parenchyme du xylème, secondairement dans le parenchyme phloémique, et s'accumulent sous forme d'agrégats dans la vacuole (Figure I-8B) (Avice *et al.*,

## A pivot de colza



## B écorce du peuplier



**Figure I-9 :** **A-** Immunolocalisation en microscopie photonique de la VSP du pivot de colza (Rossato *et al.*, 2002a). **B-** Immunolocalisation en microscopie électronique des BSP (32 et 36 kDa) dans les corps protéiques (PB) des cellules du parenchyme de l'écorce du peuplier (Van Cleve *et al.*, 1988). La coloration brune (A) ou la présence de grains d'or colloïdal (voir les flèches noires) révèle la présence de VSP. P= phloème; PB= corps protéique; GA ou S= amidon; V= vacuole.

1996a). Chez le colza, la VSP de 23 kDa présente une localisation vacuolaire au sein des cellules du parenchyme cortical périphérique du pivot, à proximité des tubes criblés du phloème (Figure I-9A) (Rossato *et al.*, 2002a). Dans le cas du peuplier, Van Cleve *et al.* (1988) ont observé que deux BSP de 32 et 36 kDa étaient stockées dans les corps protéiques des cellules du parenchyme de l'écorce (Figure I-9B). La VSP de 17,3 kDa du trèfle se situe dans le cytosol, à proximité du tonoplaste des cellules parenchymateuses des stolons (Goulas, 2001).

La localisation généralement vacuolaire peut présenter un intérêt du fait de la présence de nombreuses hydrolases et la proximité des vaisseaux conducteurs, constituer un avantage pour faciliter le transport du produit d'hydrolyse des VSP.

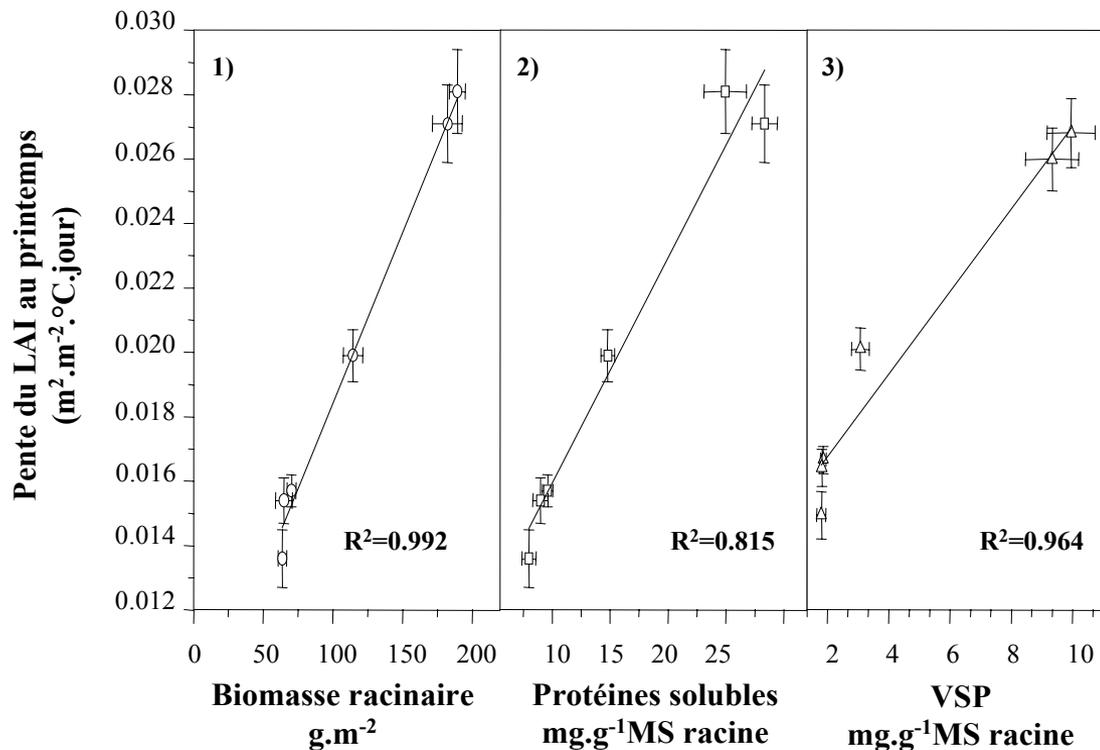
### **III-B- Fonctions physiologiques des VSP**

#### **III-B-1- Fonction de réserve azotée**

Pour les végétaux cités précédemment (Tableau I-I), les VSP constituent un moyen de stocker de l'azote de façon temporaire dans des tissus de réserves spécifiques et présentent un certain nombre d'avantages par rapport à d'autres formes de stockage de l'azote (Millard, 1988 ; Chapin *et al.*, 1990 ; Heilmeier et Monson, 1994). Ce stockage transitoire de l'azote sous forme protéique (notamment lorsque le dépôt des VSP est effectué au niveau vacuolaire), même s'il est énergétiquement plus coûteux que d'autres formes de stockage, permet probablement de contribuer à l'homéostasie osmotique des tissus, l'accumulation sous forme de nitrate provoquant par exemple des déséquilibres osmotiques. Il constitue également un moyen d'améliorer l'efficacité d'utilisation de l'azote en conservant cet élément à plus ou moins long terme au sein d'un tissu de réserve sans engendrer de profondes modifications du métabolisme cellulaire. De plus, Millard (1988) souligne que le processus de mise en réserve sous forme protéique au niveau foliaire permet à la feuille de continuer à réaliser la réduction du  $\text{NO}_3^-$ .

D'autre part, de nombreux travaux ont montré que les réserves azotées et plus particulièrement les VSP, du fait de leur caractère souvent limitant, jouaient un rôle prépondérant au cours de périodes critiques du développement des plantes (Staswick, 1994 ; Volenec *et al.*, 1996 ; Ourry *et al.*, 2001 ; Bewley, 2002). Elles contribuent de manière significative à la fourniture d'azote nécessaire à des stades de développement où la croissance est particulièrement intense (édification de l'appareil reproducteur, réactivation des méristèmes en sortie de période hivernale, repousse après une coupe...) et elles sont considérées par certains auteurs comme des indicateurs potentiels du statut azoté d'une plante ou d'un organe (Lawrence *et al.*, 1997).

Chez le colza, la VSP interviendrait lors de la transition entre le stade végétatif et le stade reproducteur en jouant un rôle dans le stockage temporaire d'azote lorsqu'un asynchronisme se



(valeurs obtenues en fin d'hiver)

**Figure I-10** : Corrélation entre la vitesse de redémarrage de croissance aérienne au printemps (exprimée par la pente du LAI (Indice foliaire)) et la biomasse racinaire (1), les teneurs en protéines solubles (2) ou les teneurs en VSP (3) des racines (pivot + racines latérales) observées en fin d'hiver chez la luzerne. Expérimentation au champ effectuée à Châlons en Champagne(d'après Justes *et al.*, 2002).

produit entre l'offre en azote (provenant pour l'essentiel de l'azote mobilisé lors de la sénescence foliaire) et la demande en azote des tissus reproducteurs. Le stockage de la VSP du colza permettrait donc de conserver l'azote issu du recyclage foliaire en attendant la mise en place des organes reproducteurs. Ces observations se rapprochent des résultats obtenus chez d'autres espèces herbacées telles que le soja où les VSP sont fortement accumulées dans les jeunes feuilles en réponse à des ablations des gousses (Wittenbach, 1983 ; Staswick, 1988 ; Tranbarger *et al.*, 1991). Même si la forte accumulation et la dégradation préférentielle des VSP du soja par rapport aux autres protéines suggèrent l'importance de leur contribution dans la mise en réserve temporaire d'acides aminés, de récentes études (Staswick *et al.*, 2001) tendent néanmoins à minimiser ce rôle. En effet, ces auteurs ont montré, à partir d'une stratégie anti-sens supprimant la synthèse de la VSP dans les feuilles de soja, que l'absence de VSP n'avait aucune incidence sur la croissance ou sur la production de graines. Cependant, cette conclusion est à nuancer car le niveau d'alimentation en azote minéral n'étant pas limitant dans le cas de cette étude, le rôle de réserve de cette VSP a probablement été fortement masqué par cette disponibilité massive en azote minéral.

Chez la luzerne, de nombreuses études ont été menées afin d'étudier le lien direct entre accumulation de VSP et le potentiel de repousse (Volenec *et al.*, 1996 ; Ourry *et al.*, 2001). Plusieurs expérimentations conduites en conditions contrôlées ou au champ ont ainsi montré que la disponibilité en azote de réserve et particulièrement la teneur en VSP sont fortement corrélées au potentiel de repousse (Ourry *et al.*, 1994 ; Volenec *et al.*, 1996 ; Avice *et al.*, 1997b ; Justes *et al.*, 2002). Par exemple, *via* l'étude de luzernes occupant des positions différentes dans le couvert (position dominante, intermédiaire ou dominée), il a été démontré que le potentiel de repousse de la luzerne après une coupe était linéairement corrélé à la teneur initiale (au jour de coupe) en protéines solubles et plus spécifiquement en VSP, alors que les teneurs initiales en azote total ou en amidon du pivot ne sont pas corrélées (Avice *et al.*, 1997b). De plus, en affectant le niveau de réserves azotées de luzernes cultivées au champ par l'application de différentes pratiques culturales telles que la variation de la date de semis, le niveau de fertilisation N, l'effet de l'irrigation (Justes *et al.*, 2002) ou l'incidence d'une coupe supplémentaire en automne (Dhont *et al.*, 2003), il est apparu une corrélation significative entre les teneurs ou les quantités de VSP par pivot observées en fin d'hiver et la vitesse de mise en place de l'indice foliaire (Justes *et al.*, 2002) (Figure I-10) ou la production de biomasse au printemps (Dhont *et al.*, 2003).

Ainsi, le recyclage au cours de la phase automno-hivernale de l'azote foliaire vers un stockage protéique dans des tissus persistants, constitue un processus essentiel chez les espèces pérennes pour conserver ces ressources azotées pendant l'hiver et les ré-utiliser plus tard au printemps. Un tel phénomène est rapporté chez les plantes ligneuses pour lesquelles l'importance

du recyclage d'azote pour la productivité est également établie (Rowland et Arora, 1997 ; Lawrence *et al.*, 2001). D'ailleurs, Gomez et Faurobert (2002) ont montré très récemment que les VSP de la tige du pêcher, malgré leur faible teneur par rapport à d'autres fractions azotées, présentaient un taux de mobilisation au printemps très supérieur aux autres pools azotés suggérant ainsi leur rôle prépondérant dans la reprise de croissance printanière.

### **III-B-2- Autres fonctions**

Selon les critères établis par Staswick (1994), la définition de VSP exclut toute autre fonction métabolique et structurale. Cependant, de plus en plus de travaux tendent à montrer qu'une fonctionnalité autre que celle de mise en réserve peut être attribuée à certaines VSP chez plusieurs espèces.

- *Rôle dans la tolérance au froid :*

L'accumulation massive de BSP<sup>1</sup> chez les espèces ligneuses au cours de la période automno-hivernale a permis d'établir des corrélations entre ce phénomène et l'acclimatation au froid chez des plantules d'épinette blanche (*Picea glauca*, Binnie *et al.*, 1994). Ceci suggère un rôle des VSP dans l'acquisition de l'endurcissement au gel. Rowland et Arora (1997) considèrent ainsi les déhydrines<sup>2</sup> et les BSP comme deux catégories de protéines dont l'abondance serait reliée à la dormance chez les plantes ligneuses. Il en est de même chez les espèces fourragères : chez le trèfle blanc, la VSP de 17,3 kDa s'accumule de façon importante en période automno-hivernale et possède des caractéristiques structurales et biochimiques propres aux protéines anti-gel ou AFP<sup>1</sup> telles qu'une structure secondaire riche en acides aminés hydrophiles ou neutres et plus particulièrement en glycine (Goulas *et al.*, 2001 ; Goulas, 2001).

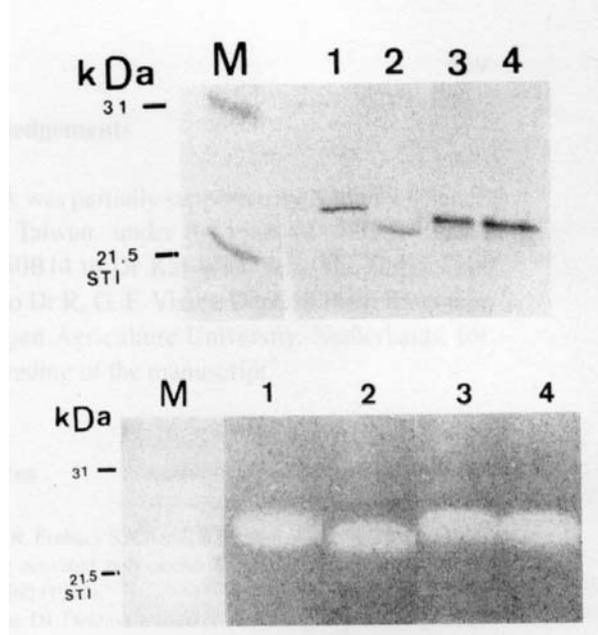
- *Activité enzymatique :*

Des activités enzymatiques variées ont également été attribuées à certaines VSP (Tableau I-I). Ainsi, Gana *et al.* (1998) ont montré que la  $\beta$ -amylase du pivot de luzerne possède une fonction de VSP. Cependant, la mobilisation d'amidon n'est pas liée à une augmentation de l'activité  $\beta$ -amylasique (comme nous l'avons détaillé dans le chapitre II-A-1-b), suggérant un rôle exclusif de réserve pour cette protéine. Chez le soja, les sous-unités des VSP de 27 et 29 kDa présentent une homologie de séquence en acides aminés avec une phosphatase acide de la tomate (Staswick, 1994) ainsi qu'avec la phosphatase acide des nodules de racines de soja (Penheiter *et al.*, 1997). De plus, une activité phosphatase acide a été rapportée pour ces deux VSP, elle semble toutefois résiduelle comparativement à l'activité phosphatase acide totale des tissus (De Wald *et al.*, 1992 ; Penheiter, 1998). Par ailleurs, Tranbarger *et al.* (1991) ont montré que des anticorps anti-

---

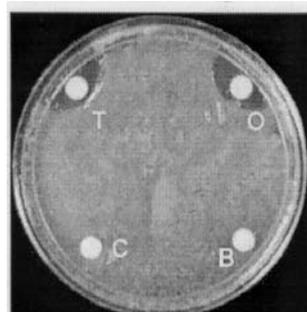
<sup>1</sup> BSP : Bark Storage Protein (protéine de réserve de l'écorce de peuplier).

<sup>2</sup> Déhydrine : protéine induite par le stress hydrique et les basses températures.

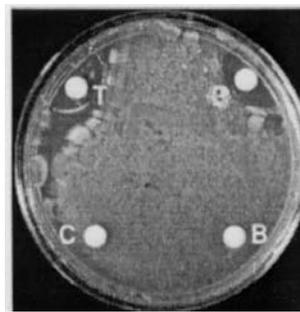


**Figure I-11** : Activité inhibitrice de trypsine de la sporamine dans le tubercule de patate douce. Profil électrophorétique (SDS-PAGE) de la sporamine ou de ses précurseurs recombinants (1,5 µg par piste). Le gel du haut correspond à une coloration au bleu de coomassie et le gel du bas à l'activité *in vitro* contre la trypsine bovine. Piste 1, presporamine; piste 2, sporamine mature; piste 3, prosporamine; piste 4, sporamine purifiée à partir de tubercule; M, marqueurs contenant la protéine inhibitrice de trypsine de soja Kunitz (STI, 21,5 kDa; ca 1,2 µg) utilisé comme témoin positif (Yeh *et al.*, 1997).

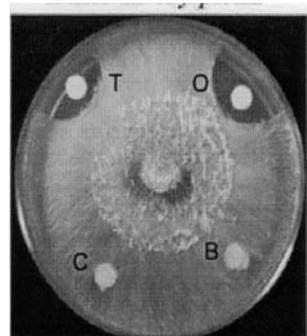
1- *Pseudomonas aureofaciens*



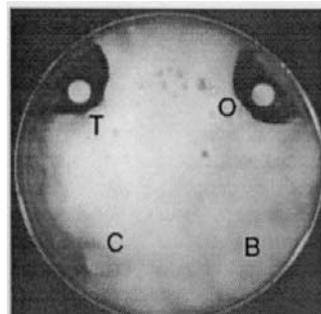
2- *Agrobacterium tumefaciens*



3- *Fusarium oxysporum*



4- *Phytophthora cinnamomi*



**Figure I-12** : Activité anti-bactérienne (1 et 2) ou anti-fongique (3 et 4) de l'ocatine chez l'oca du Pérou. Effet de disques filtrants contenant des extraits de protéines solubles totales de tubercule d'oca (T), de protéines solubles basiques (B), d'ocatine purifiée (O) ou d'un tampon témoin (C) sur la croissance *in vitro* des bactéries *Pseudomonas aureofaciens* (1) et *Agrobacterium tumefaciens* (2) et des champignons *Fusarium oxysporum* (3) et *Phytophthora cinnamomi* (4) sur milieu agar (d'après Flores *et al.*, 2002).

lipoxygénase croisent avec la VSP de 94 kDa de la feuille de soja et que celle-ci possède une activité lipoxygénase. Les lipoxygénases correspondent à une famille multigénique. Certaines d'entre-elles rempliraient la double fonction de réserve temporaire d'azote et d'enzyme active dans l'hydroxydation des lipides (Bunker *et al.*, 1995 ; Stephenson *et al.*, 1998 ; Fischer *et al.*, 1999 ; Dubbs et Grimes, 2000). Il a été suggéré que ces lipoxygénases moduleraient à la fois les processus de signalisation et de défense impliquant le métabolisme des lipides et la mise en réserve transitoire d'azote dans les cellules du mésophylle paraveineux des feuilles de soja (Fischer *et al.*, 1999).

- *Rôle dans la résistance contre les pathogènes:*

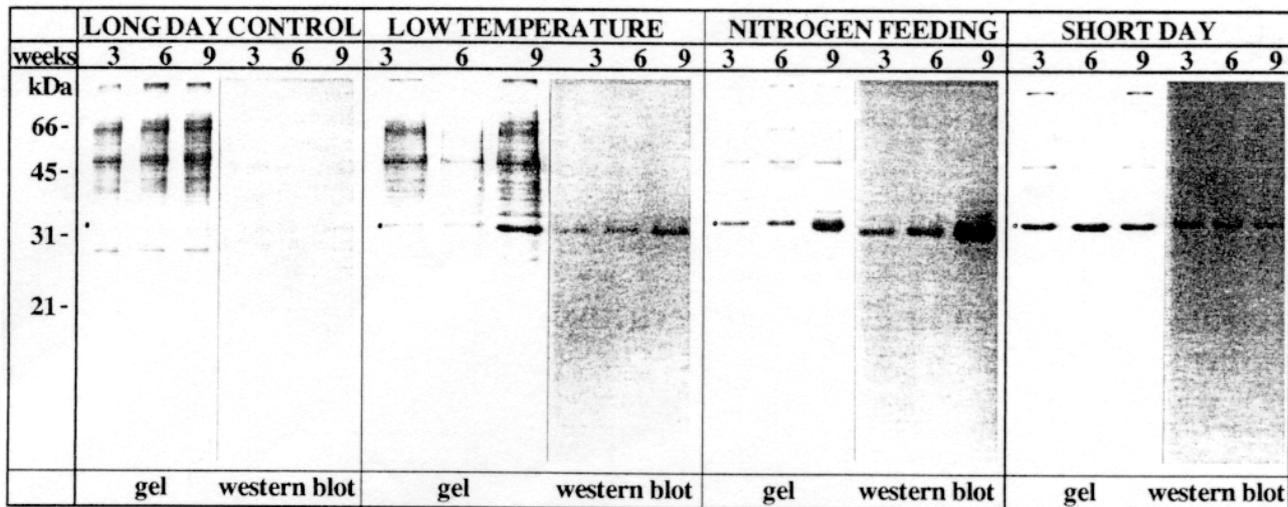
Selon certains auteurs tels que Staswick (1994) et Creelman et Mullet (1997), la synthèse de VSP pourrait être considérée comme une réponse adaptative à la blessure ou à l'attaque de pathogènes. Ainsi, chez l'arabette des dames, les deux VSP sont clairement impliquées dans les mécanismes de réponse locale à une attaque d'insecte herbivore (Berger *et al.*, 2002). Chez le pissenlit, Xu *et al.* (2000) ont rapporté que la VSP de 18 kDa, pour laquelle la variation de transcrits dans les racines et le collet est saisonnière (avec une accumulation à l'automne et un déclin au printemps), présente une forte homologie de séquence avec plusieurs allergènes et des protéines de réponse aux pathogènes (PR proteins<sup>2</sup>). La VSP de 17,3 kDa du trèfle présente également 70 % d'homologie de séquence en acides aminés avec une PR protein de pois (Goulas, 2001).

Par ailleurs, Yeh *et al.* (1997) ont montré que le gène de la sporamine (VSP de la patate douce représentant 60 à 80 % des protéines solubles totales de la racine tubérisée) pouvait être induit à la fois localement et de façon systémique par les blessures au niveau des feuilles (Tableau I-I). De plus, la sporamine partage des homologies de séquence nucléotidiques avec les inhibiteurs de trypsine (appartenant aux PR proteins) et présente une forte activité inhibitrice de la trypsine *in vitro* (Figure I-11). La patatine, accumulée dans les tubercules de pomme de terre présente une activité de lipide acyl-hydrolase (Andrews *et al.*, 1988) et possède un rôle protecteur contre les dommages engendrés par les insectes phytophages (Strickland *et al.*, 1995). D'autre part, chez la pomme de terre, Tonón *et al.* (2001) ont isolé une  $\beta$ -1,3 glucanase (enzyme impliquée dans la défense contre les champignons) de séquence identique à la patatine. Plus récemment, Flores *et al.* (2002) ont caractérisé dans les tubercules d'oca du Pérou (*Oxalis tuberosa* Mol.) une VSP dénommée ocatine possédant une activité anti-fongique et anti-bactérienne *in vitro* ainsi que des homologies de séquences en acides aminés avec des protéines qui s'accumulent en réponse à la blessure (Figure I-12).

---

<sup>1</sup> AFP : Anti Freeze Protein (protéine "anti-gel").

<sup>2</sup> PR protein : Pathogenesis Related Protein (protéines induite par l'attaque de pathogènes).



**Figure I-13** : Effets de l'héméropériode (Jour long = 16h ou jour court = 8h à 22°C), de l'abaissement de la température (de 22°C à 14°C) et du niveau de nutrition azotée (4 mM de  $\text{NH}_4^+$ , 20 mM de  $\text{NO}_3^-$ ) sur le niveau d'accumulation de la BSP de 32 kDa dans les branches du peuplier. Gel : Profils électrophorétiques des protéines solubles après SDS-PAGE. Western blotting : Immunodétection de la protéine de 32 kDa. Les standards de masse moléculaire sont indiqués sur la gauche du gel et la présence de la BSP est indiquée par un point sur le gel (d'après Van Cleve et Apel, 1993).

Chez les espèces ligneuses, Yoshida *et al.* (1994) ont mis en évidence l'accumulation saisonnière caractéristique pour une lectine dans l'écorce du robinier faux-acacia (*Robinia pseudoacacia*) suggérant ainsi sa classification parmi les BSP. De la même façon, des études plus récentes réalisées chez le mûrier noir (*Morus nigra*) relatent une accumulation de deux protéines, l'une dans le cytoplasme, l'autre dans la vacuole et appartenant à une famille de lectines. Elles agiraient en tant que BSP dans l'écorce en conditions normales et comme protéine de défense non spécifique en cas d'attaque par un herbivore ou un insecte phytophage (Van Damme *et al.*, 2002). Par ailleurs, chez le peuplier, l'homologie de séquence existant entre la BSP de l'écorce et la protéine WIN 4 induite par la blessure au niveau foliaire suggère qu'elles peuvent toutes les deux posséder un rôle de mise en réserve d'azote. De même, la BSP pourrait avoir été impliquée antérieurement dans les mécanismes de défense et avoir évolué vers un rôle de réserve en perdant sa fonction de défense (Coleman *et al.*, 1992, 1994 ; Lawrence *et al.*, 1997).

Ces différents exemples suggèrent que les VSP peuvent posséder d'autres rôles que celui de mise en réserve durant les stades de développement spécifiques. Ainsi, certaines d'entre elles semblent être impliquées dans les mécanismes de défense contre les pathogènes tout en permettant de préserver les ressources azotées des plantes pour une remobilisation ultérieure pour la croissance ou le passage au stade reproducteur.

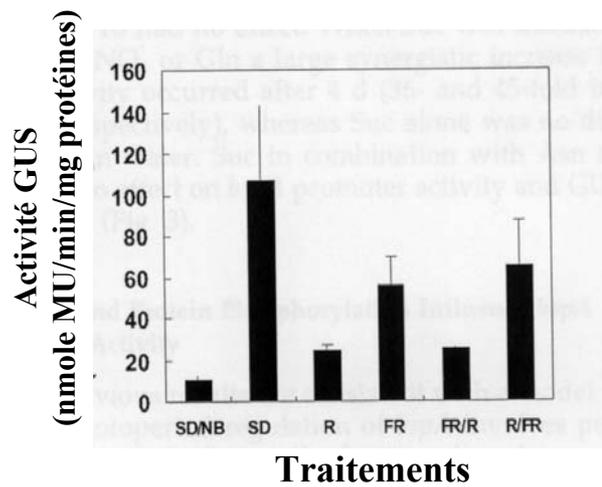
### **III-C- Facteurs de régulation de l'accumulation des VSP**

La synthèse des VSP et dans une moindre mesure leur dégradation ont été largement étudiées ces dernières années mais certains aspects concernant leur régulation restent méconnus (Staswick, 1994). Des travaux réalisés chez les espèces ligneuses montrent qu'elles sont régulées de manière saisonnière et répondent à des variations de température ou d'héméroperiode ou encore de disponibilité en azote (Coleman *et al.*, 1991, 1992 ; Langheinrich et Tischner, 1991 ; Clausen et Apel, 1991). Il s'avère également que de nombreuses VSP sont régulées selon le stade de développement et peuvent être induites en période de stress (blessure ou déficit hydrique) comme le montrent de nombreuses études réalisées chez le soja (Staswick, 1994) et chez l'arabette des dames (Berger *et al.*, 1995).

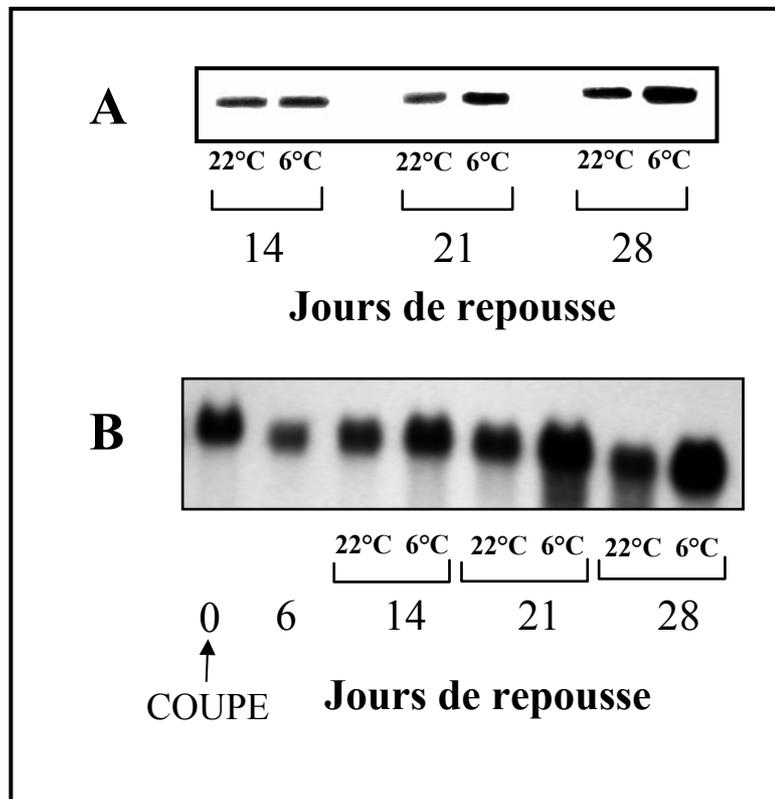
Dans le chapitre suivant, nous développerons les connaissances concernant les facteurs environnementaux ou endogènes les plus susceptibles d'induire directement ou indirectement une augmentation de l'accumulation des VSP.

#### **III-C-1- Effet de la réduction de l'héméroperiode et de la température**

- *Réduction de l'héméroperiode :*



**Figure I-14** : Incidence de l'héméropériode (jour court avec ou sans flash lumineux appliqués au milieu de la phase nocturne) sur l'activité du promoteur du gène *bsp* (32 kDa) dans les tiges de peupliers transformés possédant un gène *bspA*-promoteur::uidA (promoteur du gène *bsp* + gène rapporteur GUS) cultivés pendant 4 semaines à 25°C. SD : jours courts (8h de jour et 16h de nuit). SD/NB : SD + flash de 15 min de lumière blanche. R : flash de 10 min de lumière rouge claire (650 nm). FR : flash de 10 min de lumière rouge sombre (750 nm). FR/R : flash de 10 min de lumière rouge sombre immédiatement suivi d'un flash de 10 min de lumière rouge claire. R/FR : flash de 10 min de lumière rouge claire immédiatement suivi d'un flash de 10 min de lumière rouge sombre (Zhu et Coleman, 2001b).



**Figure I-15** : Effets de l'abaissement de la température du système racinaire (de 22°C à 6°C) sur le niveau d'accumulation de la VSP de 17,3 kDa (**A**- Western blotting) et de son transcrite (**B**- Northern blotting) dans les stolons du trèfle au cours de la repousse après défoliation. 0 = jour de coupe (d'après Goulas, 2001).

Coleman *et al.* (1991) puis Van Cleve et Apel (1993), ont suivi l'effet d'une héméropériode courte (8h de jour, 16h de nuit) sur le niveau d'accumulation de la BSP de 32 kDa du peuplier (*Populus x canadensis*). A partir de 3 semaines d'exposition en jours courts, la BSP de 32 kDa (Figure I-13) et son niveau d'ARNm s'accumulent de façon très significative alors qu'en jours longs, ni l'un ni l'autre ne sont détectés. En utilisant des anticorps anti-BSP de 32 kDa, Van Cleve et Apel (1993) ont confirmé ces résultats par Western blotting et immunodétection (Figure I-13). D'après Coleman *et al.* (1991), un traitement "jours courts" d'une période de 10 jours chez *Populus deltoides* suffit pour observer une augmentation de 20 % de l'abondance relative de cette BSP. Elle peut ainsi représenter environ 50 % des protéines solubles de l'écorce du peuplier après 17 jours de traitement en héméropériode courte. L'accumulation des ARNm de BSP en réponse aux jours courts est également observée chez les plantes en conditions naturelles (en septembre) (Coleman *et al.*, 1992).

Des résultats préliminaires issus des travaux de Langheinrich et Tischner (1991) suggéraient l'implication d'une famille de photorécepteurs appelés phytochrome dans la perception du signal "jour court". Le phytochrome<sup>1</sup> existe sous deux formes interconvertibles : la forme physiologiquement inactive (Pr) est convertie en forme active (Pfr) par la lumière rouge claire et Pfr est converti en Pr par la lumière rouge sombre (Quail *et al.*, 1995). La construction de gène chimère par fusion du promoteur de la BSP du peuplier avec la  $\beta$ -galacturonidase (activité GUS) a permis l'étude de son expression au niveau transcriptionnel (Zhu et Coleman, 2001a, b). Ainsi, une interruption de la phase nocturne par un flash lumineux de lumière blanche de 15 minutes, chez des plantes placées en jours courts, inhibe l'activité GUS (Figure I-14). Il en est de même lorsque la phase nocturne est interrompue par un flash de 10 minutes de lumière rouge claire (Figure I-14). L'ensemble de ces données a confirmé que le système phytochrome intervenait dans la perception du signal "jour court" induisant l'accumulation de la BSP.

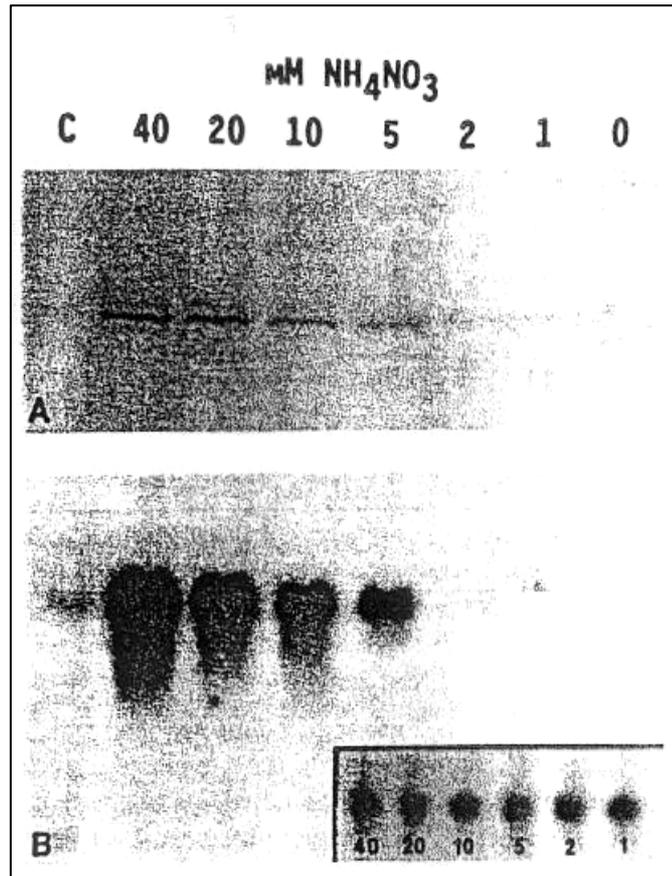
- *Abaissement de la température :*

La synthèse des protéines de réserve peut être induite par une réduction de l'éclairement journalier mais aussi sous l'effet d'autres facteurs environnementaux. Ainsi, la réduction de la température de 22°C (jour) / 18°C (nuit) à 14°C (jour) / 8°C (nuit) chez le peuplier induit dans un premier temps, l'accumulation des transcrits, puis de la protéine (Van Cleve et Apel, 1993 ; Figure I-13). Il faut toutefois remarquer, que ce soit au niveau de l'expression des ARN ou de la synthèse des protéines, que l'effet d'un abaissement de la température est moins rapide que celui d'un raccourcissement de l'héméropériode (Figure I-13).

Chez le trèfle blanc, Goulas *et al.* (2001) ont montré que la VSP de 17,3 kDa s'accumulait en réponse aux basses températures, ce qui a été récemment confirmé par l'augmentation de

---

<sup>1</sup> phytochrome : photorécepteur de type chromoprotéine (groupement chromophore tétrapyrrolique + protéine).



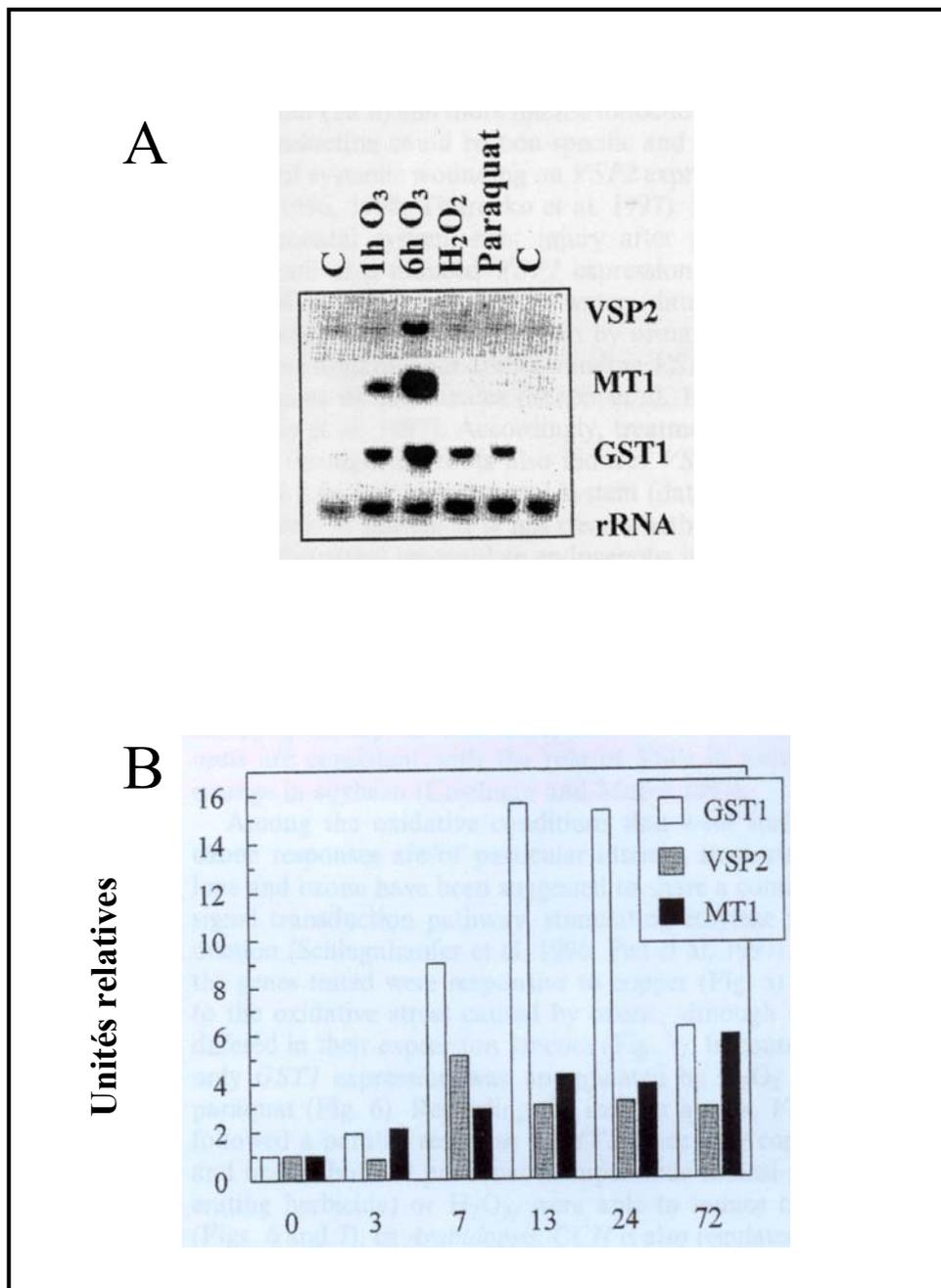
**Figure I-16** : Incidence du niveau de nutrition azotée (de 0 à 40 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) sur le niveau d'accumulation de la VSP B (29 kDa) et sur l'expression de l'ARNm codant les VSP A (27 kDa) et B (29 kDa) dans les feuilles de jeunes plantes de soja non nodulées. **A-** Immunodétection après western blotting de la VSP B. **B-** Northern blotting sur des extraits d'ARN totaux de feuilles de soja hybridés avec un mélange équimolaire de sondes ADNc vspA et vspB marquées au  $^{32}\text{P}$ . Un contrôle (C) correspondant à des plantes de soja nodulées ayant le même âge est présenté sur la gauche de la membrane. La sonde ADNc marquée au  $^{32}\text{P}$  qui code la petite sous-unité de la RubisCO est utilisée pour vérifier si les dépôts d'ARN totaux sont les mêmes pour chaque traitement (d'après Staswick *et al.*, 1991).

l'expression des transcrits correspondants après exposition du système racinaire à 6°C (Goulas, 2001 ; Figure I-15).

### **III-C-2- Effet de la disponibilité en azote du milieu**

Lorsque des peupliers sont cultivés sur une période de 9 semaines en présence de 4 mM d'ammonium et 20 mM de nitrate, Van Cleve et Apel (1993) ont constaté que l'allongement des jeunes branches se poursuit sans formation de bourgeons terminaux et qu'il y a un développement de nouvelles feuilles tout au long du traitement. Une augmentation du niveau de nutrition azotée favorise l'accumulation de la BSP (32 kDa). Cette accumulation est significative dès la 3<sup>ème</sup> semaine de traitement (Figure I-13). Après 6 et 9 semaines d'alimentation azotée, le stockage de BSP s'accroît pour atteindre des niveaux d'accumulation qui dépassent ceux observés pour des peupliers cultivés en héméropériode courte (Figure I-13). D'après les résultats obtenus par northern blot, il apparaît que le stockage de BSP observé avec un apport d'azote minéral résulte en fait de l'induction de l'expression du gène codant cette protéine de réserve (Van Cleve et Apel, 1993). Coleman *et al.* (1994) ont également montré une accumulation de la protéine et du transcrit de la BSP après 4 semaines de traitement avec  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  et l'accumulation croît avec la concentration (de 1 à 50 mM). Cependant, pour une durée de traitement plus longue (6 ou 8 semaines), seule la concentration en protéines augmente avec la concentration en azote. Le déclin au niveau des transcrits pourrait être lié soit à un effet toxique se traduisant par des symptômes visibles, soit à un mécanisme de rétrocontrôle.

Ces résultats suggèrent qu'en plus de son rôle de mise en réserve saisonnière, la BSP du peuplier pourrait aussi jouer un rôle plus temporaire (ponctuel) de réserve azotée pendant les périodes où l'azote est présent en excès, ce qui la rapprocherait du soja chez lequel les VSP de la feuille sont absentes dans le cas de déficience en azote et sont au contraire, fortement exprimées lorsque la concentration en azote minéral de la solution nutritive est augmentée (Staswick *et al.*, 1991). La figure I-16 montre chez le soja, l'effet d'un apport croissant en nitrate d'ammonium sur le niveau d'accumulation des VSP A et B (de 27 et 29 kDa, respectivement) et le niveau d'expression des gènes correspondants. Les analyses par SDS-PAGE (Figure I-16A) et par northern blot avec des sondes ADNc de VSP A et B (Figure I-16B) montrent que l'expression des gènes codant ces 2 protéines de réserve augmente en fonction de la concentration en nitrate d'ammonium apporté. L'effet semble à priori spécifique puisque des apports élevés de potassium, phosphore ou soufre sont en revanche sans effet sur le niveau d'accumulation de ces VSP (Staswick, 1990). Cependant, d'après Staswick (1994), l'azote ne contrôlerait pas directement l'expression des gènes des VSP du soja : cet effet dépendrait vraisemblablement de changements dans les relations entre organes sources et organes puits.



**Figure I-17** : **A**- Effet de différents stress oxydatifs sur l'expression du gène de la VSP 2 sur des rosettes d'arabette des dames. Les plantes sont exposées soit à 160 nL.L<sup>-1</sup> d'ozone pendant 1h ou 6h, 100 mM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 30 minutes ou pulvérisées avec 5 mM de paraquat et récoltées après 30 minutes. Northern blotting d'ARN hybridés avec une sonde ADNc marquée au <sup>32</sup>P codant pour VSP2, MT1 ou GST1. La sonde ADNc codant pour l'ARN 18S ribosomal (18S) est utilisée pour contrôler le chargement égal entre pistes. **B**- Niveau d'expression des transcrits de VSP2, GST1 et MT1 chez l'arabette des dames après exposition à 160 nL.L<sup>-1</sup> d'ozone pendant 3, 7, 13, 24 ou 72 heures. GST1 : glutathion S transférase et MT1 : métallothionine sont des gènes liés au stress (Mira *et al.*, 2002).

Des chicorées (*Cichorium intybus*) cultivées sur des milieux pauvres en azote (1,5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ou riches en azote (18 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ont été comparées lors de la période d'obscurité forcée nécessaire à la formation du chicon. Il apparaît que la plante a beaucoup moins recours à la mobilisation de la VSP (17 kDa) lorsque la disponibilité en azote nitrique est accrue (Limami *et al.*, 1996). En cas de nutrition azotée limitante, l'azote absorbé est utilisé prioritairement pour alimenter les racines tubérisées et la mise en réserve d'azote sous forme de VSP est retardée par rapport aux plantes correctement alimentées en azote (Améziane *et al.*, 1997). Néanmoins, même dans ces conditions d'alimentation nitrique limitante, la plante est capable de constituer son stock d'azote (sous forme de VSP et d'arginine).

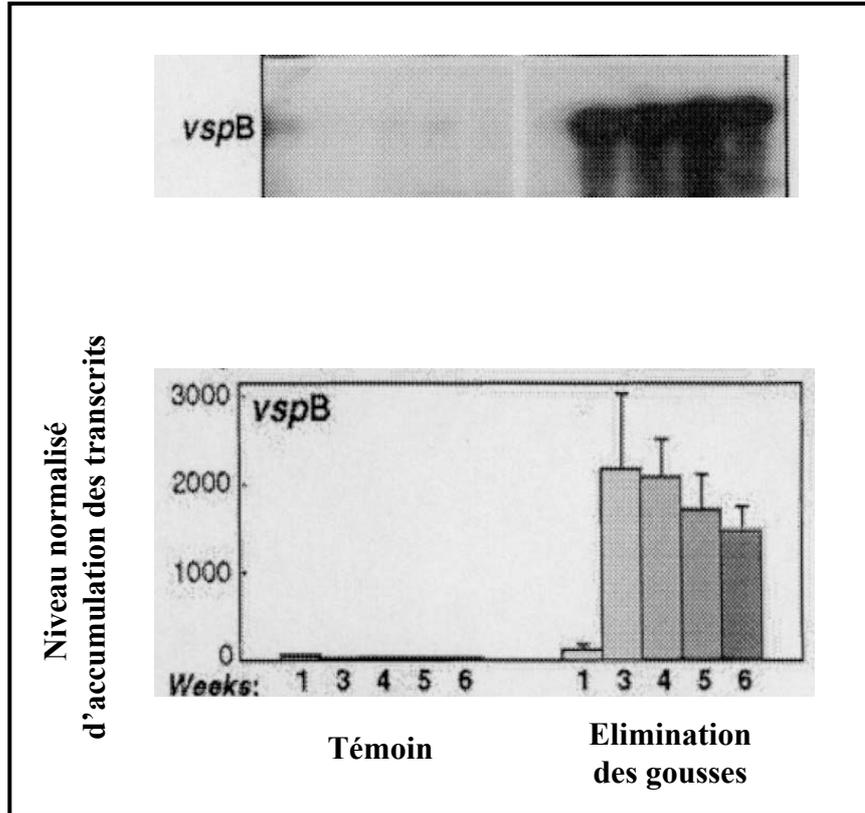
Enfin, chez le colza, un apport azoté accru (1 à 50 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) n'a pas d'effet sur la synthèse de la protéine de 23 kDa au niveau du pivot (Rossato *et al.*, 2002a).

Au vu de ces données, il semblerait que le niveau de disponibilité en azote minéral soit un facteur capable de stimuler directement ou indirectement l'accumulation d'azote sous forme de VSP au niveau des organes aériens. En revanche, l'effet d'une augmentation de la fertilisation azotée sur la mise en réserve de VSP au niveau des organes racinaires est nettement moins significatif. L'azote favorisant la croissance aérienne, on peut penser qu'il serait plus favorablement stocké au niveau aérien qu'au niveau racinaire lorsqu'il est en excès.

### **III-C-3- Effet de différents stress**

De récents travaux (Mira *et al.*, 2002) évoquent les effets de différents facteurs de stress oxydatif usuellement impliqués dans les phénomènes de sénescence, dans l'accumulation des VSP chez l'arabette des dames. Les transcrits VSP2 sont induits après 6h d'exposition à l'ozone (Figure I-17A) et ils présentent un taux 5 fois plus élevé par rapport au début de l'expérience après 7h de traitement (Figure I-17B). D'autre part, l'application de cuivre au niveau racinaire a permis d'induire les gènes codant les VSP (Mira *et al.*, 2002). Ainsi, les conditions de stress qui induisent la mobilisation de protéines (telles que la RubisCO), entraînent un stockage d'azote sous forme de VSP. L'induction de l'expression des transcrits codant la VSP peut alors constituer une réponse secondaire à différents signaux provoquant une redistribution d'azote.

La blessure appliquée au niveau foliaire induit les gènes de VSP chez l'arabette des dames (Berger *et al.*, 1995 ; Utsugi *et al.*, 1998). L'activation locale de l'expression des VSP (transcrits et protéines) intervient non seulement après une blessure mécanique mais également en réponse à l'attaque d'insectes herbivores (Berger *et al.*, 2002). Lawrence *et al.* (1997), par l'analyse de séquence des gènes codant la BSP du peuplier, ont localisé une séquence nucléotidique homologue (60 %) exprimée dans la feuille et appelée *win 4*. Cette protéine WIN 4 est très abondante dans les jeunes feuilles. Par ailleurs, la synthèse des transcrits *win 4* ainsi que du gène



**Figure I-18** : Effets de l'élimination continue des gousses sur le niveau d'expression de l'ARNm codant la VSP B de 29 kDa par Northern blotting dans la feuille de soja. Le témoin correspond à des plantes où les gousses sont laissées en place (d'après Stephenson *et al.*, 1998).

*pni 288* récemment identifié comme appartenant à la famille des BSP du peuplier, est induite par une blessure foliaire (Davis *et al.*, 1993 ; Lawrence *et al.*, 2001). Cependant, la synthèse de ces deux transcrits n'est pas induite par un traitement en jour court. La régulation de ces 3 gènes est donc différente mais leurs produits pourraient jouer un rôle important dans la mise en réserve d'azote chez les plantes ligneuses (Lawrence *et al.*, 2001).

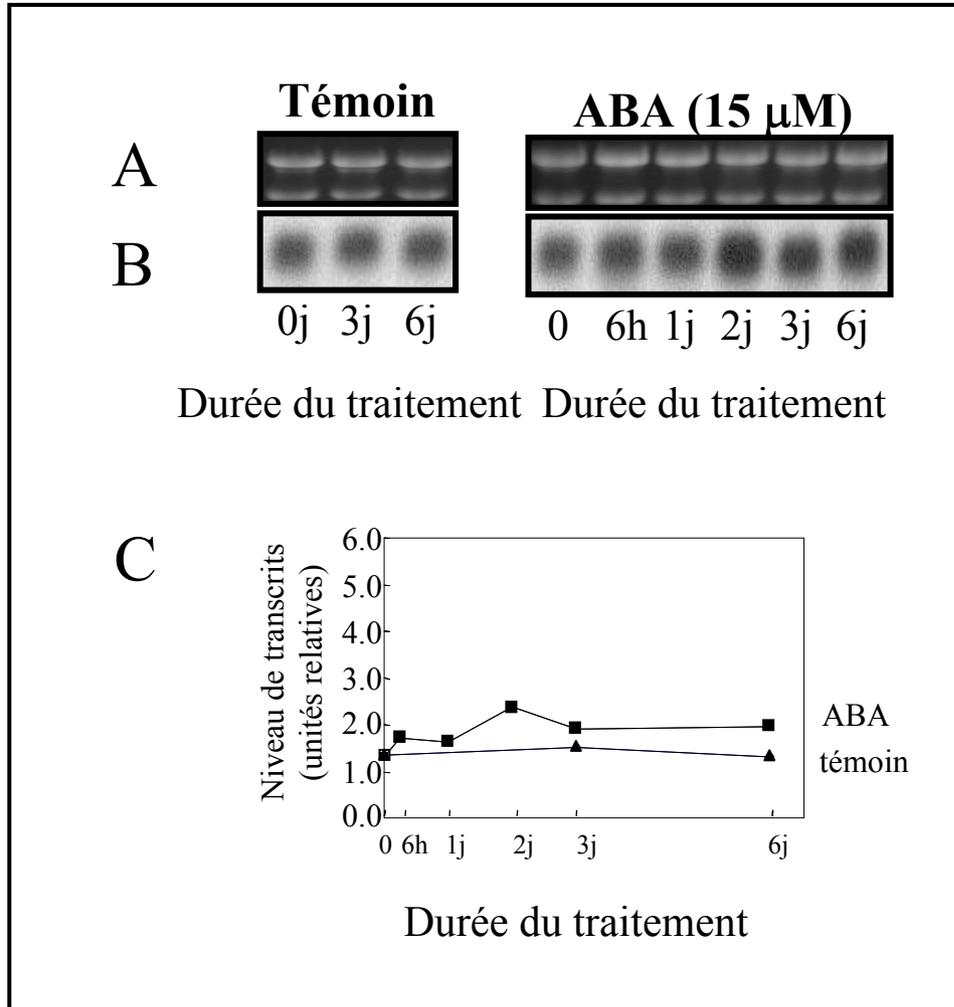
Chez le soja, la blessure des feuilles augmente l'expression des ARNm de VSP dans les 24 heures au niveau de la partie endommagée ainsi que sur le reste de la feuille non blessée (Mason et Mullet, 1990). La blessure induit également l'accumulation des ARNm de VSP B chez les jeunes plantes étiolées (Mason et Mullet, 1990).

### **III-C-4- Effet d'une perturbation des relations source-puits**

Comme cela a déjà été évoqué dans les chapitres précédents concernant les effets de l'héméropériode courte ou de l'azote minéral, l'accumulation de VSP peut être la conséquence d'un changement des relations entre organes source ou puits pour l'azote ou autrement dit, d'une modification de la distribution de l'azote entre les tissus, que celui-ci soit d'origine exogène ou issu d'un recyclage interne.

Lorsque la croissance est inhibée chez le peuplier par l'application de jours courts, le niveau d'activité du promoteur du gène de BSP augmente (Zhu et Coleman, 2001b) ; ce qui suggère l'existence de relations entre la croissance et la régulation de l'expression de la BSP. Par ailleurs, Coleman *et al.* (1992, 1993) ont montré que la dégradation de la BSP et la remobilisation d'azote seraient liées à la demande des puits (croissance active des bourgeons). En héméropériode longue, les feuilles matures sont des sources, les feuilles en croissance et les apex sont des puits importants pour l'azote, les BSP stockées dans l'écorce sont alors fortement mobilisées. Van Cleve et Apel (1993) ont alors suggéré que l'héméropériode pourrait réguler la synthèse de BSP indirectement en induisant le début de la sénescence foliaire. Selon ces auteurs, l'augmentation des pools d'acides aminés libres, résultant de la protéolyse foliaire, serait plus directement responsable de la synthèse de VSP. Un traitement en jour court accélère l'entrée en dormance des bourgeons du peuplier et modifie donc les relations source-puits en provoquant une inhibition de la croissance et une baisse de la demande en azote (Arora *et al.*, 1992). Cependant, Coleman *et al.* (1993) ont montré que ce sont les jours courts qui induisent spécifiquement la synthèse de BSP et non la diminution de la demande due à un arrêt de végétation. Le stockage et la remobilisation de l'azote chez le peuplier sont donc déclenchés soit par des signaux externes comme la longueur du jour, soit par des signaux internes liés à l'état des relations source-puits (Gaudillère, 1997).

Chez le soja, lors du passage du stade végétatif au stade reproducteur, la suppression des gousses (organe puits le plus important à ce stade du développement) au fur et à mesure de leur



**Figure I-19** : Niveau d'expression des transcrits du gène de la VSP de 17,3 kDa dans les racines du trèfle blanc de plantes témoin (**A**) ou traitées pendant 6 jours avec de l'acide abscissique (**B**, ABA 15  $\mu$ M). **A**- Observation sous UV des ARN totaux après traitement au bromure d'éthidium permettant de vérifier le chargement égal entre pistes d'ARN (20  $\mu$ g par piste). **B**- Northern blotting d'ARN hybridés avec une sonde ADNc marquée au  $^{32}$ P codant pour la VSP de 17,3 kDa. **C**- Quantification relative du niveau d'expression des transcrits de la VSP de 17,3 kDa chez les plantes témoin ou traitées avec de l'ABA (d'après Goulas, 2001).

formation entraîne de profondes modifications des relations entre organes sources et organes puits. Il en résulte que la redistribution de l'azote des feuilles entrées en sénescence est essentiellement dirigée vers les jeunes feuilles. Staswick (1988) a étudié l'effet de la suppression des gousses du soja sur les produits de la traduction *in vitro* des ARNm codant les VSP A et B (27 et 29 kDa). Il démontre ainsi que cette modification des relations entre organes source et organes puits provoque une forte accumulation du contenu en VSP A et B dans les jeunes feuilles qui résulte de l'induction de l'expression des transcrits codant ces protéines. Des travaux plus récents de Stephenson *et al.* (1998), réalisés *in vivo* sur des feuilles de soja à la suite de l'élimination des gousses, ont confirmé l'accumulation des VSP A et B ainsi que l'induction de l'expression des gènes correspondants, en réponse à ce traitement (Figure I-18). Tranbarger *et al.* (1991) ont fait les mêmes conclusions au niveau de l'accumulation et de l'expression des transcrits codant la VSP de 94 kDa de la feuille de soja lors de la suppression des gousses.

### **III-C-5- Effet des phytohormones et autres molécules signal**

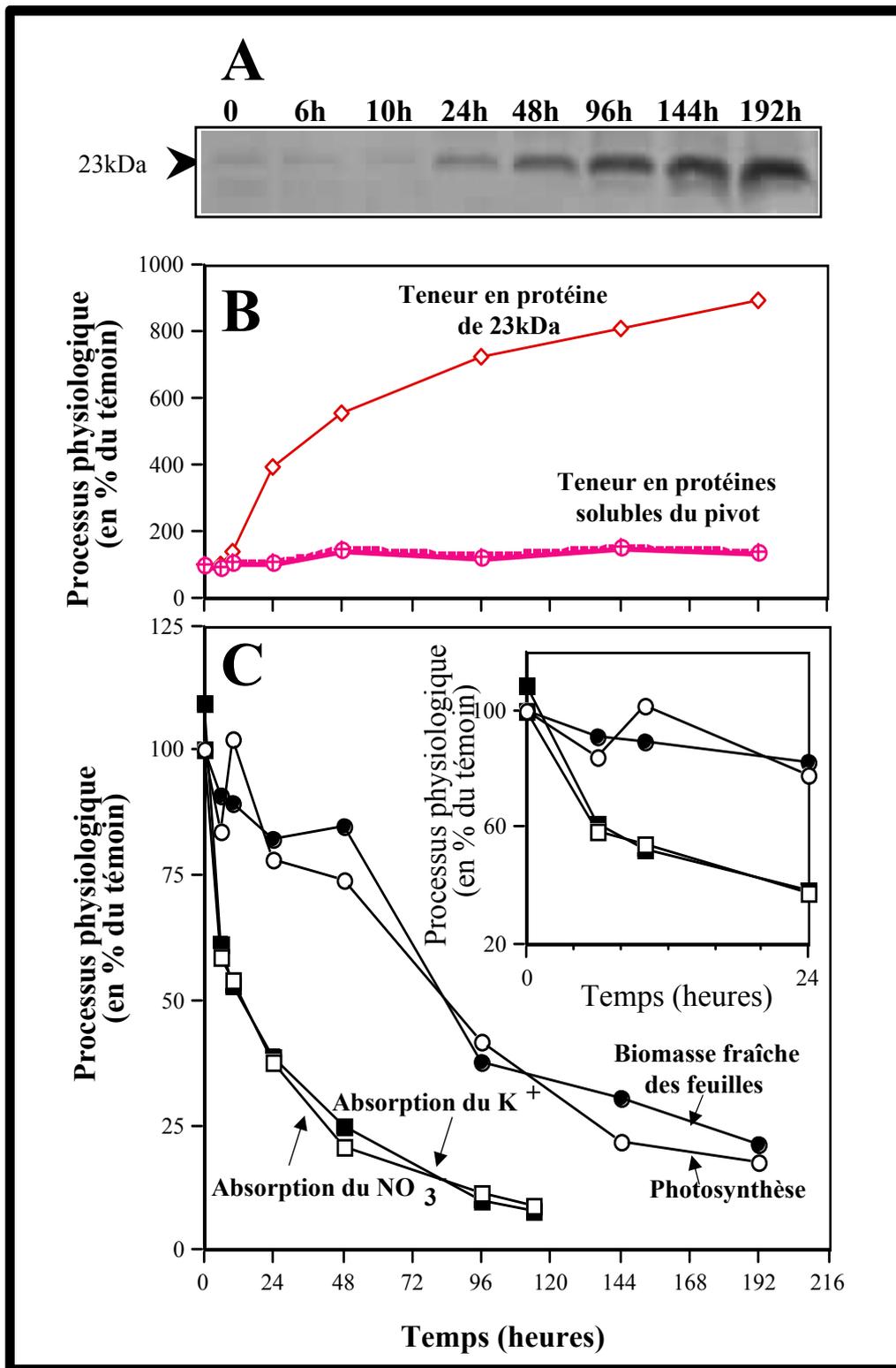
La modulation de l'accumulation des VSP par des modifications environnementales, des pratiques culturales ou bien des perturbations des relations source-puits suppose l'intervention de signaux endogènes capables de relayer l'effet de ces facteurs exogènes au sein de la plante.

#### **III-C-5-a- L'acide abscissique**

L'acide abscissique (ABA) est une hormone inductible par le stress osmotique, impliquée dans de nombreuses réponses des plantes aux contraintes environnementales incluant la sécheresse, les basses températures, les jours courts, la salinité du sol, l'attaque de pathogènes ou la blessure (Luan, 2002). L'application de l'ABA augmente la tolérance au froid chez de nombreuses espèces herbacées ou ligneuses (Welling *et al.*, 1997 ; Tamminen *et al.*, 2001). Son effet a été récemment étudié sur l'accumulation des VSP chez le trèfle blanc. Ainsi, un apport racinaire ou une pulvérisation foliaire d'ABA (5 à 15  $\mu\text{M}$ ) induit une accumulation de la VSP de 17,3 kDa et de son transcrite (Figure I-19) et pourrait contribuer à la résistance au gel (Goulas, 2001). D'autre part, l'ABA peut être impliqué dans les phénomènes de sénescence ou notamment le stress hydrique (Noodén, 1988 ; Zeevaart et Creelman, 1988). D'ailleurs, une application racinaire d'ABA (6,2  $\mu\text{M}$ ) durant 10 jours permet d'induire l'accumulation de la VSP de 23 kDa chez le colza (Rossato *et al.*, 2002b).

#### **III-C-5-b- L'acide jasmonique**

L'acide jasmonique et son dérivé méthylé (le méthyl jasmonate ou MeJA), dont la synthèse dérive de l'acide linoléique, peut être libéré à la suite d'une dégradation des membranes cellulaires (Vick et Zimmerman, 1986). Il est largement distribué chez les végétaux (Meyer *et al.*, 1984), dans les jeunes organes en croissance (extrémités des tiges et des racines, feuilles, fleurs,



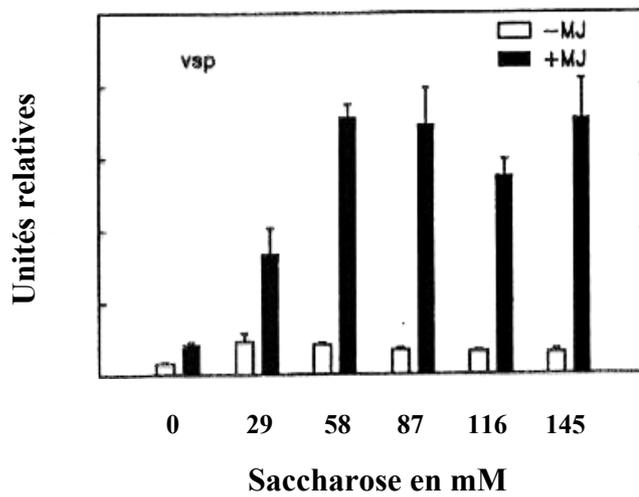
**Figure I-20** : Effets relatifs d'un apport de MeJA en fonction du temps d'application chez le colza. **A-** Effet sur l'accumulation de la VSP de 23 kDa déterminée par immunodétection après western-blotting des protéines solubles du pivot. **B-** Teneur en VSP de 23 kDa et en protéines solubles du pivot. **C-** Absorption du  $NO_3^-$  et du  $K^+$ , photosynthèse et biomasse fraîche des feuilles. Les différents paramètres mesurés sont exprimés en % du témoin. L'encart représente les effets du MeJA sur les 24 premières heures (d'après Rossato *et al.*, 2002b).

fruits immatures) (Staswick, 1992). Il s'agit d'un régulateur de croissance et de développement et il joue également le rôle de signal dans les mécanismes de défense et de réponse à la blessure (Xu *et al.*, 2001). L'acide jasmonique et ses dérivés sont impliqués dans la régulation de l'expression de nombreux gènes (Creelman et Mullet, 1997) et influencent plusieurs processus incluant de façon non exhaustive la production de pollen viable, la maturation des fruits, la croissance racinaire, la formation de tubercule ou encore la résistance des plantes aux insectes et aux pathogènes (Staswick, 1992).

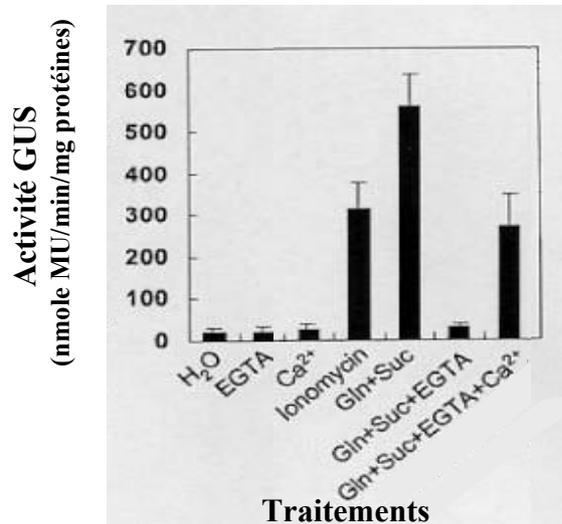
Parmi les protéines de réserve inductibles par les jasmonates, les VSP du soja ont été particulièrement étudiées. Ainsi, le MeJA et l'acide jasmonique (JA) induisent rapidement l'expression des gènes des VSP sur des plantes entières, des feuilles excisées, des racines ou des suspensions de cellules foliaires de soja (Mason et Mullet, 1990 ; Anderson, 1991 ; Staswick *et al.*, 1991). De plus, l'acide jasmonique augmente rapidement les niveaux d'ARNm de VSP B même dans des feuilles de plantes déficientes en azote. Il aurait donc un rôle plus direct que l'azote (Staswick, 1994).

Chez le peuplier, Beardmore *et al.* (2000) ont montré que le MeJA (20  $\mu$ M) induit une augmentation rapide (72h) de l'expression des gènes de la BSP et de *win4* suivie d'une accumulation des protéines correspondantes. A plus long terme (4 semaines), l'augmentation des teneurs en azote et en protéines est associée à une augmentation du rapport de biomasse parties aériennes/parties racinaires. Ainsi, comme ce fût décrit antérieurement chez le soja (Staswick *et al.*, 1991, Franceschi et Grimes, 1991), le MeJA pourrait agir en deux temps sur l'accumulation des VSP. D'abord, il aurait un rôle immédiat et direct sur l'expression génique puis un effet retardé et indirect sur la répartition de l'azote, en bouleversant les relations entre organes source et organes puits et en menant à l'allocation préférentielle de l'azote dans les organes de réserve.

Chez le colza, l'absorption d'azote se trouve réduite de 89 % après 15 jours de traitement au MeJA (100  $\mu$ M) alors que dans le même temps, l'accroissement de la sénescence foliaire conduit à une forte remobilisation de l'azote des feuilles vers la hampe et le pivot (Rossato *et al.*, 2002a). De plus, l'accumulation de la VSP de 23 kDa est fortement stimulée (elle représente alors 16 % des protéines solubles). Des études cinétiques ont permis de montrer que de nombreux processus physiologiques sont affectés selon un ordre chronologique précis (Figure I-20). L'absorption d'azote est inhibée par le MeJA en moins de 6h, la photosynthèse ainsi que la teneur en chlorophylles réduites après 24h. De plus, la croissance, et celle des feuilles en particulier, est affectée significativement au-delà de 48h de traitement et la répartition de la biomasse au sein de la plante est modifiée *via* une réduction du rapport biomasse aérienne/biomasse racinaire (Rossato *et al.*, 2002b). Le MeJA serait, chez le colza, impliqué dans le mécanisme de sénescence foliaire et dans la remobilisation de l'azote endogène des feuilles qui en résulte, ce qui favoriserait



**Figure I-21 :** Incidence de l'apport de saccharose sur l'induction par le MeJA de l'expression de l'ARNm codant la VSP B (29 kDa) dans des cultures cellulaires de feuilles de soja. Les suspensions de cellules foliaires sont placées sur un milieu contenant différentes concentrations en saccharose en présence de 10 $\mu$ M de MeJA (+MJ) ou en absence de MeJA (-MJ). Les Northern blots sont réalisés sur des extraits d'ARN totaux de feuilles de soja mis en présence d'une sonde ARN marquée au  $^{32}$ P qui s'hybride avec les ARNm vspB. La sonde ADNc marquée au  $^{32}$ P qui code la  $\beta$ -tubuline est utilisée pour vérifier si les dépôts d'ARN totaux sont les mêmes pour chaque traitement (résultats non présentés). D'après Mason *et al.* (1992).



**Figure I-22 :** Incidence de la glutamine (Gln), du saccharose (Suc) et du calcium sur l'activité du promoteur du gène *bsp* (mesurée par l'activité GUS) sur des rameaux excisés de peuplier. Des rameaux de peupliers transformés (possédant le gène *bspA*-promoteur::*uidA*) sont placés 48h sur de l'eau puis incubés pendant 48h (25°C, 16h de jour-8h de nuit) dans différentes solutions. H<sub>2</sub>O : eau; EGTA : 5mM d'EGTA (chélateur de calcium); Suc/Gln : 200 mM de saccharose seul ou 25 mM de glutamine seule; Ca<sup>2+</sup> : 50 mM de CaCl<sub>2</sub>; Ionomycin : 100 nM d'ionomycine (ionophore permettant l'accumulation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire); Gln+Suc : 25 mM de glutamine+200 mM de saccharose; Gln+Suc+EGTA : 25 mM de glutamine+200 mM de saccharose+5 mM d'EGTA; Gln+Suc+EGTA+Ca<sup>2+</sup> : 25 mM de glutamine+200 mM de saccharose+5 mM d'EGTA+50 mM de CaCl<sub>2</sub>. D'après Zhu et Coleman (2001b).

l'accumulation de la VSP dans le pivot alors que contrairement à ce qui peut être observé chez le soja (Mason *et al.*, 1992), la blessure n'induit pas d'accumulation particulière de VSP chez le colza.

### **III-C-5-c- Autres phytohormones et molécules signal**

Chez le soja, l'apport d'autres régulateurs de croissance simultanément au traitement par le MeJA a mis en évidence que la régulation des VSP dépend en fait de la balance hormonale. Ainsi, un analogue synthétique de l'auxine ajouté au MeJA tend à diminuer l'effet inducteur de ce dernier (De Wald *et al.*, 1994). En étudiant l'incidence des concentrations en sucres solubles et du MeJA sur l'expression des VSP de cultures cellulaires de feuilles de soja, Mason *et al.* (1992) ont montré qu'une faible concentration en saccharose en présence de MeJA stimule fortement l'induction de l'expression des transcrits, accentuant l'effet inducteur du MeJA seul (Figure I-21). La présence de saccharose seul n'a pas d'effet significatif sur l'expression des ARNm de la VSP B. Cet effet synergique est maximal pour une concentration de 58 mM de saccharose et de 10  $\mu$ M de MeJA (Figure I-21). Mason *et al.* (1992) se sont également intéressés à l'expression du gène *vsp* B en fonction de la nature du sucre soluble apporté. Un apport de fructose ou de glucose augmente fortement la stimulation de l'expression de *vsp* B par le MeJA. Lorsque des acides aminés (glutamine et asparagine) sont apportés avec le saccharose, il y a inhibition de l'induction par le MeJA d'environ 30 % par rapport au traitement saccharose + MeJA.

Les travaux de Zhu et Coleman (2001a, b) montrent que l'induction du promoteur de la BSP du peuplier par les jours courts ou par une diminution de la croissance (ainsi que nous l'avons vu précédemment) est relayée au sein de la plante par la modification des équilibres hormonaux. En effet, la pulvérisation de gibbérellines inhibe l'effet inducteur des jours courts sur l'expression du gène de la BSP du peuplier (Zhu et Coleman, 2001a, b) en favorisant la croissance aérienne des plantes alors que l'application d'inhibiteurs de la voie de synthèse des gibbérellines produisent l'effet inverse.

Néanmoins, l'effet direct des phytohormones reste à démontrer chez le peuplier : il est probable que l'expression des BSP dépendrait en fait des signaux métaboliques impliqués dans la répartition des assimilats entre organes source et organes puits. Parmi différents métabolites carbonés et azotés, la glutamine (Figure I-22) et l'ammonium agissent en synergie avec le saccharose (Zhu et Coleman, 2001b). Au niveau cellulaire, l'induction de l'accumulation du transcrit des VSP chez le peuplier (Figure I-22 ; Zhu et Coleman, 2001b) ou la patate douce (Ohto *et al.*, 1995) par le saccharose implique les ions  $\text{Ca}^{2+}$  ainsi que la phosphorylation des protéines dans la transduction du signal.

## IV- CONCLUSION ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

L'analyse bibliographique révèle que nos deux modèles d'étude, la luzerne (plante pérenne) et le colza d'hiver (plante bisannuelle), sont confrontées à la nécessité de remobiliser l'azote mis en réserve pendant des phases de développement où les capacités de prélèvement de l'azote sont insuffisantes ou ralenties. Ces périodes correspondent à la mobilisation de VSP préalablement accumulées au sein d'organes végétatifs, ce qui leur confère un rôle important dans le mécanisme de mise en réserve comme nous l'avons développé précédemment (Chapitre II). Les VSP ont été caractérisées chez de nombreuses espèces herbacées et ligneuses et les mécanismes de régulation de leur accumulation ont été particulièrement étudiés chez certaines d'entre elles.

Ainsi, l'étude de facteurs environnementaux tels que température et héméroperiode a été entreprise chez le peuplier du fait de l'accumulation de protéines de réserve en période automno-hivernale et d'une remobilisation à la reprise de croissance au printemps, modèle se rapprochant du fonctionnement de la luzerne. Par ailleurs, l'implication de facteurs endogènes (hormones, sucres...) a fait l'objet de plusieurs travaux en particulier chez le soja, le peuplier ou l'arabette des dames. Les mécanismes de blessure ont également été étudiés.

Cependant, chez la luzerne, les mécanismes intervenant dans les phénomènes de régulation du métabolisme des VSP n'ont pas été identifiés. Des études réalisées récemment chez le colza (Rossato *et al.*, 2002a, b) ont permis la mise en évidence de l'effet de certaines hormones (MeJA, ABA) sur l'accumulation de la VSP de 23 kDa et suggèrent une régulation en lien avec les mécanismes de sénescence selon un mode de fonctionnement se rapprochant de celui du soja. Ainsi, l'ensemble des facteurs intervenant sur la régulation de l'accumulation de ces VSP est sans doute étroitement liée à la modification de la répartition des assimilats (en fonction des relations source-puits) au cours du développement du végétal.

Face aux interrogations qui sont soulevées sur la nature des facteurs exogènes ou endogènes capables de moduler le niveau d'accumulation des VSP chez la luzerne et le colza, les objectifs de ces travaux de thèse étaient les suivants :

**1/ Etudier l'effet de différents facteurs environnementaux** (héméroperiode, température et nutrition azotée) **et endogènes** (phytohormones telles que le MeJA) **susceptibles de favoriser l'accumulation des VSP chez la luzerne** (variété Europe) **en conditions contrôlées.**

L'incidence des différents traitements sur la redistribution de l'azote au sein de la plante a été évaluée par marquage isotopique  $^{15}\text{N}$ . La mise en réserve des VSP a été suivie plus précisément grâce à la mise au point d'un dosage par la méthode ELISA. D'autre part, une approche

moléculaire a été envisagée par l'étude de l'accumulation des transcrits de l'une des VSP : la  $\beta$ -amylase, grâce à une sonde ADNc fournie par l'équipe américaine dirigée par le Professeur J.J. Volenec (Département d'Agronomie, Purdue University, West Lafayette, INDIANA, USA) dans le cadre d'une collaboration initiée en 1993 avec l'UMR INRA-UCBN 950 EVA de CAEN (**Premier chapitre de résultats**).

**2/ Etudier plus précisément les conséquences d'une héméroperiode courte** par un raccourcissement de la durée d'éclairement en cinétique **sur deux variétés de luzerne** (Europe et Lodi qui présentent un potentiel différent d'accumulation des VSP, Avice *et al.*, (1997b)) **et mettre en évidence l'implication potentielle du phytochrome dans l'accumulation des VSP en réponse aux jours courts**. L'approche moléculaire a pu être élargie par l'acquisition lors de mon séjour dans le laboratoire du Professeur J.J. Volenec, d'une sonde ADNc supplémentaire correspondant à la VSP de 32 kDa (**Deuxième chapitre de résultats**).

**3/ Chez le colza**, les acquis préalables sur la régulation de la VSP en conditions contrôlées ou au champ ont permis d'envisager **une étude plus approfondie des mécanismes concernant les relations entre organes source et organes puits pour l'azote au cours du cycle de culture**.

Dans ce but, une expérimentation en conditions de plein champ conduite en 2001 sur la variété Capitol visait à altérer les relations source-puits *via* la suppression d'organes source ou puits à partir de la montaison et à en préciser les conséquences sur la gestion de l'azote. Un marquage isotopique  $^{15}\text{N}$  effectué sur des périodes de 7 jours a permis d'évaluer, au cours du développement ontogénétique, les changements d'allocation d'azote entre organes et l'incidence sur la mise en réserve d'azote, particulièrement sous forme de la VSP de 23 kDa. (**Troisième chapitre de résultats**).

Ces trois chapitres de résultats sont présentés sous forme de 3 articles accompagnés d'un résumé en français. Un chapitre sera dédié à la description des expérimentations et des méthodes d'analyses utilisées pour réaliser l'ensemble de ces études. Au final, l'ensemble de ces résultats fera l'objet de discussions générales et de conclusions tout en proposant quelques perspectives à ces travaux.

## ***CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES***

---

---

**Tableau II-I :** Composition de la solution nutritive pour la culture en hydroponie, sur sable ou sur perlite de *Medicago sativa* L.(variété Europe et Lodi).

Macroéléments	mM	Microéléments	μM
CaCl <sub>2</sub>	3,0	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	14,0
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0	MnSO <sub>4</sub>	5,0
MgSO <sub>4</sub>	0,5	ZnSO <sub>4</sub>	3,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,7
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,15	CuSO <sub>4</sub>	0,7
Fe-Na-EDTA	0,2	CoCl <sub>2</sub>	0,1

## **CHAPITRE II :**

### **MATERIELS ET METHODES**

---

#### **I- CONDITIONS DE CULTURE ET PROTOCOLES EXPERIMENTAUX**

##### **I-A- Mise en place de la culture de luzerne en conditions contrôlées (Chapitres III et IV)**

Pour les travaux effectués sur la luzerne (*Medicago sativa* L.), deux variétés ont été cultivées : Europe (Chapitre III et IV) et Lodi (Chapitre IV). La variété Europe a été utilisée car elle constitue l'une des variétés les plus cultivées sous nos latitudes alors que la variété Lodi a été choisie pour sa capacité d'accumulation de VSP dans le pivot, supérieure à Europe (Avice *et al.*, 1997b).

Les semences de luzerne (variétés Europe et Lodi) sont stérilisées en surface avec de l'éthanol à 80 % (v/v) pendant 30 secondes puis avec de l'hypochlorite de sodium à 20 % (v/v) pendant 30 minutes. Elles sont ensuite rincées abondamment à l'eau déminéralisée et mises à germer sur sable (Chapitre III) ou sur un substrat synthétique (Oasis growing pinpot, Agrimedia, Chapitre IV). Le semis est arrosé quotidiennement avec une solution nutritive (composition indiquée au sein du Tableau II-I) à 3 mM de  $\text{KNO}_3$  (Chapitre III) ou 2 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Chapitre IV) afin d'éviter la formation des nodosités responsables de la fixation symbiotique du  $\text{N}_2$ . Lorsque la première feuille trifoliée apparaît au-dessus des autres (environ quinze jours après le semis), les plantes sont repiquées, à raison de 3 à 4 par pot, sur du sable (Chapitre III) ou de la perlite (Chapitre IV) pour obtenir un pivot bien développé. Pendant cette pré-culture réalisée en serre, elles sont arrosées tous les 2 à 3 jours avec 300 mL de solution nutritive. Après 4 mois de pousse, les luzernes sont coupées à 6 cm au-dessus du collet et sont transférées sur milieu liquide, dans des pots contenant 8 litres de solution nutritive (Tableau II-I) en présence de 1 mM de  $\text{KNO}_3$  (Chapitre III) ou de 1 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Chapitre IV). La solution est continuellement aérée et renouvelée tous les cinq jours. Le pH est maintenu à 6,5 grâce à un apport en excès de  $\text{CaCO}_3$  à 2mM (concentration finale) à chaque changement de solution nutritive. Après deux semaines de culture en milieu hydroponique, différents traitements sont appliqués (Figures II-1 et II-2). La mise en place de ces traitements est décrite dans le § I-C. A ce stade, la solution nutritive qui est renouvelée tous les cinq jours, comporte tous les éléments précédemment cités, mais la source d'azote minéral ( $\text{KNO}_3$ , Chapitre III ou  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , Chapitre IV) est marquée à l'azote 15.

Les plantes sont cultivées en salle climatisée. Elles reçoivent un éclairage artificiel dispensé par des lampes à sodium haute pression (phytoclaude 400 W ; valeur moyenne du PAR obtenu à 15 cm au-dessus du collet :  $400 \mu\text{moles de photons. s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ ).

### **I-B- Mise en place de la culture de colza en conditions de plein champ (Chapitre V)**

L'expérimentation a été réalisée sur une parcelle agricole située près de Ouistreham (Calvados). Le géotype de colza (*Brassica napus* L.) choisi est Capitot. Il s'agit d'une lignée pure. Elle réalise l'essentiel de son rendement grain sur les parties apicales de la plante (et notamment sur l'inflorescence principale). Elle est précoce à la reprise de végétation (Février), mi-tardive à floraison et à maturité. Les rendements sont en général très bons et de l'ordre de 40 quintaux par hectare (Rossato, 2001).

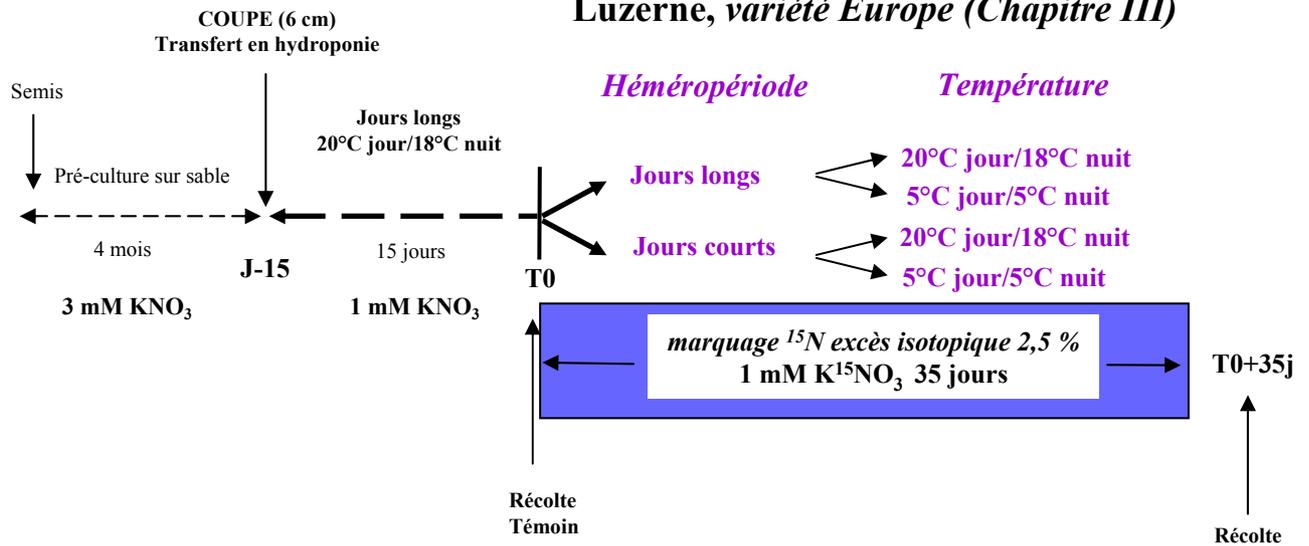
Le semis a été réalisé le 10 Septembre 2000. La moyenne des précipitations reçues de Mars à Juillet 2001 est de 379 mm. Les températures mensuelles moyennes sont :  $9,1^{\circ}\text{C}$  en Mars ;  $9,9^{\circ}\text{C}$  en Avril ;  $12,8^{\circ}\text{C}$  en Mai ;  $15,8^{\circ}\text{C}$  en Juin et  $17,9^{\circ}\text{C}$  en Juillet. La parcelle a reçu une fertilisation azotée sous forme de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  de  $75 \text{ kg}.\text{ha}^{-1}$  et  $150 \text{ kg}.\text{ha}^{-1}$  respectivement en Février et Mars 2001.

### **I-C- Protocoles expérimentaux**

Chez la luzerne, Ces divers traitements sont appliqués au cours de la période de ré-accumulation des réserves carbonées et azotées qui débute après dix à quinze jours de repousse suivant une coupe. En effet, la phase de mobilisation des réserves azotées intervient durant les 2 premières semaines de repousse alors que leur ré-accumulation n'est significative qu'au-delà de cette période (Kim *et al.*, 1993a ; Avice *et al.*, 1996a). Après quinze jours de repousse en milieu hydroponique (1mM  $\text{KNO}_3$ , Chapitre III ou 1mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , Chapitre IV ; 16h de d'héméropériode,  $20^{\circ}\text{C}$  jour/  $18^{\circ}\text{C}$  nuit), un lot de plantes témoin est récolté (T0 = début de l'expérimentation, excepté pour l'expérimentation II du Chapitre IV) puis les différents traitements décrits ci-après sont appliqués.

## TRAITEMENTS APPLIQUES pendant 35 jours

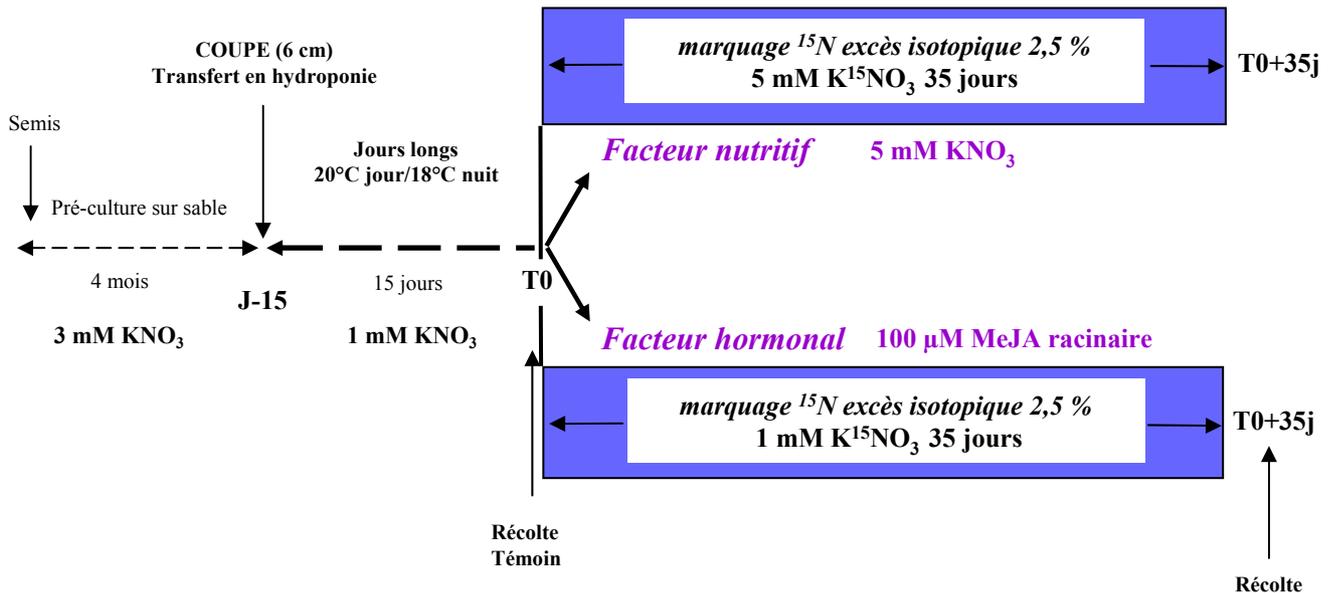
### Luzerne, variété Europe (Chapitre III)



**Figure II-1** : Protocole expérimental utilisé pour l'étude de l'influence de l'héméropériode (jours longs : 16h jour/8h nuit et jours courts : 8h jour/16h nuit) et de la température ( $20^\circ\text{C}$  jour/ $18^\circ\text{C}$  nuit,  $5^\circ\text{C}$  jour/ $5^\circ\text{C}$  nuit) pendant 35 jours sur la répartition et la mise en réserve d'azote sous forme de VSP chez la luzerne (variété Europe).

## TRAITEMENTS APPLIQUES pendant 35 jours

### Luzerne, variété Europe (Chapitre III)



**Figure II-2** : Protocole expérimental utilisé pour l'étude de l'influence de l'augmentation de la nutrition azotée (de 1 à 5 mM de  $\text{KNO}_3$ ) et de l'apport racinaire de MeJA ( $100 \mu\text{M}$ ) pendant 35 jours sur la répartition et la mise en réserve d'azote sous forme de VSP chez la luzerne (variété Europe).

### **I-C-1- Effet des facteurs environnementaux, nutritifs et hormonaux chez la luzerne (Chapitre III)**

#### **I-C-1-a- Incidence de l'héméropériode et des basses températures**

Afin d'étudier l'incidence de l'héméropériode et de la température sur la répartition de l'azote et sa mise en réserve sous forme de VSP, plusieurs lots de plantes de luzerne (*cv* Europe) sont cultivés en jours longs ou courts et à différentes températures pendant 35 jours (Figure II-1). Chaque traitement est appliqué sur quatre pots de 4 plantes. Les plantes en conditions de **jours longs** sont éclairées **16h** ; celles qui sont en **jours courts** seulement **8h**. Pour chaque type d'héméropériode, un lot de plantes est placé soit en chambre climatisée (**20°C jour/18°C nuit**), soit en chambre phytotronique (**5°C jour /5°C nuit**) (Figure II-1).

#### **I-C-1-b- Incidence de l'augmentation de la nutrition azotée et de l'apport de MeJA**

Ces facteurs sont étudiés par l'apport de **5 mM de KNO<sub>3</sub>** (marqués à l'azote 15 avec un excès isotopique de 2,5 %) dans la solution nutritive ou **l'application racinaire de 100 µM de MeJA** (Figure II-2). Chaque traitement est appliqué sur trois ou quatre pots de 4 plantes cultivées pendant 35 jours en jour long (16h jour/8h nuit) et à une température de 20°C jour/18°C nuit.

L'azote de la solution nutritive pour les plantes placées en héméropériode longue ou courte, à température ambiante ou à 5°C (Figure II-1) et traitées au MeJA (Figure II-2), est apporté sous forme de KNO<sub>3</sub> (1mM) et marqué à l'azote 15 avec un excès isotopique de 2,5 %.

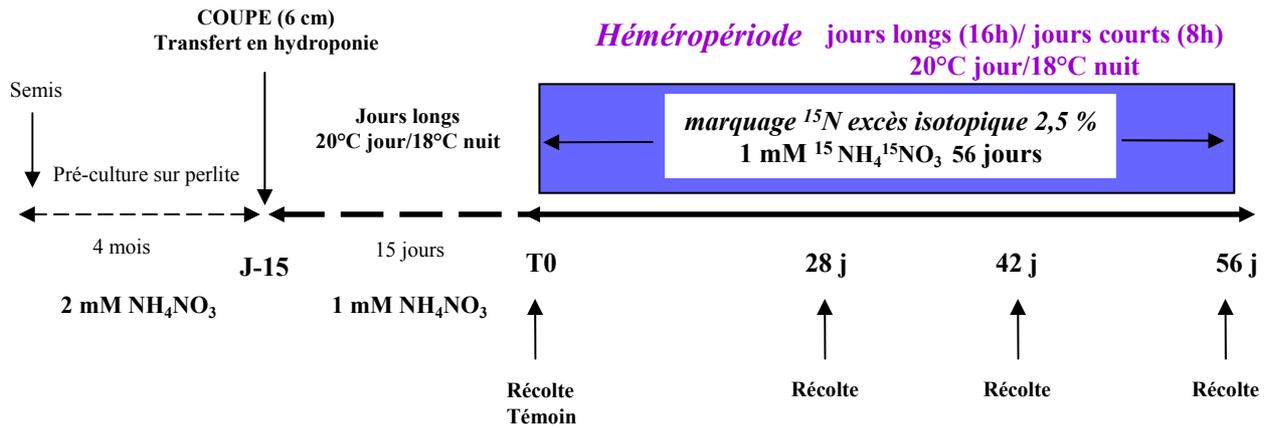
### **I-C-2- Etude cinétique de l'héméropériode courte chez la luzerne (Chapitre IV)**

#### **I-C-2-a- Comparaison des effets de la variation de l'héméropériode sur 2 variétés (Chapitre IV, expérimentation I)**

L'expérimentation est conduite durant 56 jours pendant lesquels l'azote de la solution nutritive est apporté tous les cinq jours sous forme de <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>15</sup>NO<sub>3</sub> (1mM) marqué à l'azote 15 avec un excès isotopique de 2,5 %. Chaque traitement est appliqué pendant 28, 42 et 56 jours sur quatre pots de 3 plantes. Les plantes placées en conditions de **jour long (LD)** sont **éclairées 16h** ; celles qui sont en **jours courts (SD)** seulement **8h** (Figure II-3). Pour chaque type d'héméropériode, les plantes sont cultivées en chambre climatisée (20°C jour/18°C nuit).

## TRAITEMENTS APPLIQUES pendant 56 jours

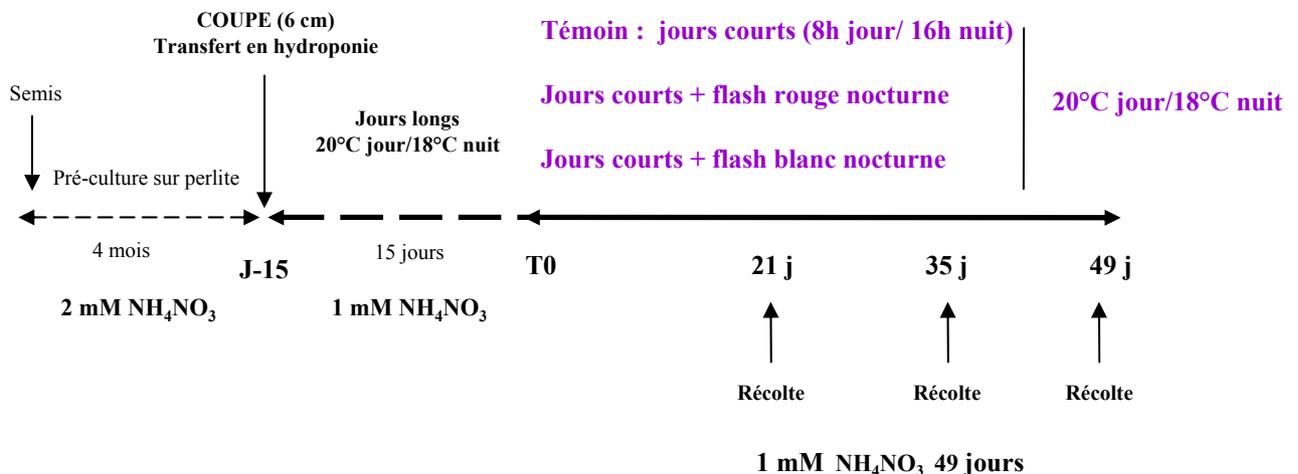
### *Luzerne, variété Europe et Lodi (Chapitre IV, expérimentation I)*



**Figure II-3** : Protocole expérimental utilisé pour l'étude de l'influence de l'héméropériode (jours longs : 16h jour/8h nuit) et jours courts (8h jour/16h nuit) appliquée pendant 28, 42 et 56 jours sur la répartition et la mise en réserve d'azote sous forme de VSP chez 2 variétés de luzerne (Europe et Lodi).

## TRAITEMENTS APPLIQUES pendant 49 jours

### *Luzerne, variété Europe (Chapitre IV, expérimentation II)*



**Figure II-4** : Protocole expérimental utilisé pour l'étude de l'intervention du phytochrome en cinétique (21, 35 et 49 jours) sur la mise en réserve d'azote sous forme de VSP chez la luzerne (variété Europe).

### **I-C-2-b- Recherche de l'intervention du phytochrome dans la perception du signal "jours courts" (Chapitre IV, expérimentation II)**

Après quinze jours de repousse en milieu hydroponique, les luzernes (variété Europe) sont placées en héméropériode courte de 8h (SD, 20°C jour/18°C nuit), elles reçoivent un éclairage artificiel dispensé par des lampes à sodium haute pression (HQE 400 W) et les différents traitements décrits ci-après sont appliqués :

- un lot de plantes reçoit un **flash de 15 min de lumière rouge (R)**, filtre rouge Flame Red,  $600 \text{ nm} \leq \lambda \leq 800 \text{ nm}$ , Lee Filters, Gestion scenique) au milieu de la phase nocturne.
- un lot de plantes reçoit un **flash de 15 min de lumière blanche (NB)** au milieu de la phase nocturne.
- un lot de plantes **Témoin** subit uniquement l'héméropériode courte (SD, 8h de jour, 16h de nuit)

L'effet des flashes lumineux (rouge ou blanc) est suivi après 21, 35 et 49 jours de traitement sur quatre pots de 3 plantes (Figure II-4). Tout au long de l'expérimentation, les solutions nutritives (composition dans le Tableau II-I) contenant 1 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  sont renouvelées tous les 3 jours.

### **I-C-3- Effet d'une modification des relations source-puits chez le colza en conditions de plein champ (Chapitre V)**

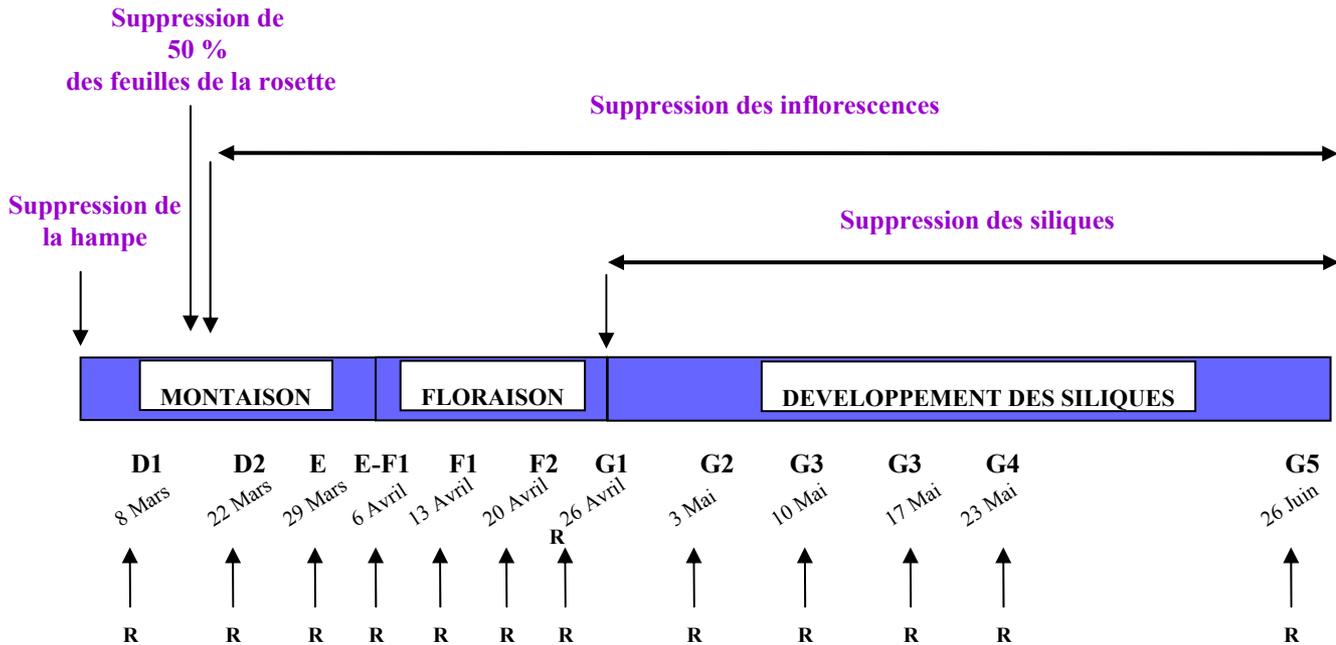
L'expérimentation a été réalisée sur des micro-parcelles de 16 m<sup>2</sup> contenant chacune un lot de plantes non traitées utilisées comme témoin et un lot de plantes pour chacun des traitements réalisés. Les bouleversements des relations source-puits pour l'azote ont été engendrés par la suppression de différents organes au cours du cycle de développement (Figure II-5). Quatre traitements ont été appliqués :

- l'ablation de la hampe** a été réalisée 5 cm au-dessus du niveau du collet alors que les boutons étaient encore accolés et cachés par les feuilles terminales (stade D1, 27 Février 2001).
  - la suppression de 50 % des feuilles de la rosette**, (considérées comme organe source) est intervenue lorsque la hampe atteignait une hauteur de 20 cm et que l'inflorescence principale était dégagée (stade D2, 14 Mars 2001).
- Ces deux premiers traitements ont eu lieu au début de la montaison.

- les organes reproducteurs ont été supprimés au fur et à mesure de leur apparition, c'est-à-dire à partir du stade D2 (14 Mars 2001) pour **l'ablation des inflorescences** et du stade G1

# TRAITEMENTS APPLIQUES pendant le cycle de culture

## Colza, variété *Capitol* (Chapitre V)



**Figure II-5** : Protocole expérimental utilisé pour l'étude en conditions de plein champ de l'influence du bouleversement des relations source-puits pour l'azote entre organes sur la répartition et la mise en réserve d'azote sous forme de VSP chez le colza (variété Capitol). R = dates de récolte.

(chute des premiers pétales, 26 Avril 2001) pour **l'ablation des siliques**, de façon continue jusqu'à la fin du mois de Juin.

- les plantes ayant un **cycle ontogénétique normal** sont utilisées comme plantes **Témoin**

Pour tous les traitements, chaque plante a été fertilisée individuellement 7 jours avant chaque récolte avec du  $\text{KNO}_3$  ( $5 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ ) marqué à l'azote 15 avec un excès isotopique de 10 % apporté en solution au pied de chaque plante ( $1,5 \text{ L}$  ;  $400 \text{ cm}^2$ ). La densité moyenne des plantes par  $\text{m}^2$  est de  $39 \pm 0,74$ . La période de floraison des plantes témoin s'est étendue du 10 Avril au 10 Mai 2001. Les dates de récolte ont été programmées à chaque observation de changement de stade phénologique des plantes témoin depuis la montaison (stade D1) jusqu'à la maturité des graines (stade G5). Ainsi, les prélèvements ont eu lieu les 8, 22, 29 Mars ; 6, 13, 19, 26 Avril ; 3, 10, 17, 23 Mai et le 26 Juin 2001.

#### **I-C-4- Récolte du matériel végétal**

##### **I-C-4-a- Cas de la luzerne (Chapitres III et IV)**

Au terme des différents traitements, le système racinaire des plantes est soigneusement rincé à l'eau osmosée pour éliminer l'azote 15 de la solution nutritive. Les lots de plantes sont ensuite séparés en six catégories :

##### ***organes néoformés après la coupe :***

- 1) nouvelles feuilles
- 2) nouvelles tiges

##### ***organes laissés en place par la coupe :***

- 3) feuilles des chaumes (vieilles feuilles)
- 4) tiges des chaumes (vieilles tiges)
- 5) pivot
- 6) racines secondaires

Les différents organes sont pesés à l'état frais. Les échantillons sont alors plongés dans l' $\text{N}_2$  liquide, lyophilisés, broyés et conservés à  $-20^\circ\text{C}$  jusqu'à quantification de l'azote total et du  $^{15}\text{N}$ , des protéines solubles totales et des VSP (pivot) ou séchés à l'étuve, broyés puis conservés dans un dessiccateur avant analyse de l'azote total et du  $^{15}\text{N}$  (organes aériens et racines latérales) et après détermination de la matière sèche. Pour l'expérimentation du Chapitre III, un lot de pivots parmi les 4 lots de plantes prévus par traitement est réservé à l'extraction d'ARN sur tissu frais. Pour cela, 2 g de matière fraîche de chaque traitement sont rapidement prélevés à 1 cm au-dessous du collet, plongés dans l' $\text{N}_2$  et immédiatement stockés à  $-80^\circ\text{C}$ .

### **I-C-4-b- Cas du colza (Chapitre V)**

A chaque récolte et pour chaque traitement, trois répétitions de 3 plantes sont séparées en racines latérales, pivot, feuilles, hampe, inflorescences et siliques. Chaque fraction est pesée à l'état frais puis séparée en 2 sous-fractions. La première est pesée et lyophilisée. Après détermination de la matière sèche (qui permettra de déduire le poids sec total de chaque fraction), le matériel végétal est broyé et conservé dans un dessiccateur avant analyse. La seconde sous-fraction est immédiatement plongée dans l'azote liquide et stockée à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Elle sera utilisée pour l'extraction de protéines solubles et analyse par SDS-PAGE et western-blot.

## **II- METHODES D'ANALYSE**

### **II-A- Quantification de l'azote total, de l'azote absorbé et mesure de la répartition de l'azote au sein de la plante**

#### **II-A-1- Dosage de l'azote total et analyse du rapport isotopique $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$**

Le système utilisé pour les analyses isotopiques comprend un spectromètre de masse ("twenty-twenty", PDZ Europa Scientific) permettant de mesurer le rapport  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ , couplé à un appareil assurant la production de  $\text{N}_2$  à partir d'échantillons solides ou liquides (Roboprep CN).

Les échantillons sous forme de poudre sèche très finement broyée, sont pesés dans des nacelles en étain de 4 mm de diamètre et de 6 mm de hauteur, de façon à injecter 80 à 100  $\mu\text{g}$  d'azote dans le spectromètre de masse. Les échantillons ainsi conditionnés sont disposés dans un injecteur en tête de la colonne de combustion (injecteur Roboprep CN). Leur injection dans la colonne d'oxydation est réalisée dans un flux d'hélium en légère surpression, afin d'éviter toute contamination par le gaz carbonique et l'azote moléculaire de l'air. La combustion des échantillons a lieu au niveau de la colonne d'oxydation ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$  et oxyde de cuivre à une température de  $1000^{\circ}\text{C}$ ). Une élévation de température ( $1600^{\circ}\text{C}$ ) assurée par un apport d'oxygène conduit à une combustion totale des échantillons. A la sortie de la colonne d'oxydation, l'échantillon se trouve alors sous forme de  $\text{N}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  et d'oxydes de carbone et d'azote. La réduction de ces derniers en  $\text{N}_2$  et  $\text{CO}_2$  est alors assurée par passage sur une colonne de cuivre métallique à  $600^{\circ}\text{C}$  (colonne de réduction). Le piégeage de l'eau et du  $\text{CO}_2$  est réalisé par passages successifs sur deux colonnes contenant respectivement du perchlorate de magnésium et du "carbosorb" (PDZ Europa Scientific).

L'azote gazeux est injecté dans le spectromètre de masse où il est d'abord ionisé. Les ions moléculaires positifs alors formés sont accélérés dans une chambre électrique, puis déviés dans un champ magnétique. Leur angle de déviation est directement affecté par le rapport de leur masse ( $m$ ) à leur charge ( $z$ ). Toutes les molécules de  $\text{N}_2$  ionisées étant de même charge, leur angle de déviation est donc uniquement conditionné par leur masse. Ainsi, la déviation de

l'azote moléculaire de masse 28 sera plus importante que celle de l'azote de masse 29, elle-même plus importante que celle de l'azote de masse 30.

Les ions sont ensuite collectés par trois détecteurs. Les signaux qui en résultent sont ensuite amplifiés puis transmis à un système informatique. La quantification de l'azote est réalisée en faisant la somme des signaux obtenus à partir des masses 28 ( $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ ), 29 ( $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ ) et 30 ( $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$ ). L'abondance isotopique en  $^{15}\text{N}$  est alors calculée par l'intermédiaire du rapport des signaux 29/28 pour de faibles excès isotopiques et 30/29 pour des excès isotopiques élevés

### **II-A-2- Détermination de la quantité d'azote total (luzerne et colza) et de la répartition de l'azote issu de l'absorption ou de l'azote préexistant (luzerne)**

Pour l'azote de masse 15, l'abondance ( $A_N$ ) est directement donnée par le spectromètre de masse. Elle correspond donc à :

$$A_N = \frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N} + ^{15}\text{N}} \times 100$$

L'excès isotopique (E) est la différence entre l'abondance isotopique d'un échantillon et celle d'une référence. Pour l'azote, l'abondance de référence est celle de l'air, soit 0,3663 %±0,0004 (Junk et Svec, 1958). Par conséquent,

$$E_N (\%) = A_N (\%) - 0,3663$$

Pour un organe donné, la quantité d'azote total  $qN_{\text{tot}}$  en mg par plante est donnée par :

$$qN_{\text{tot}} = (\% \text{ N} \times \text{MS})/100$$

avec % N = pourcentage d'azote dans la matière sèche

MS = matière sèche d'un organe exprimée en mg par plante

**Pour l'expérimentation réalisée au champ sur colza**, la quantité de  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  disponible est supposée identique entre plantes pour une date de fertilisation donnée. Ainsi, la comparaison entre traitements est possible pour une date de récolte donnée. La quantification de  $^{15}\text{N}$  correspond à une mesure de la quantité d'azote absorbé durant les 7 jours précédant chaque récolte et peut donc être ainsi distinguée de l'azote endogène non marqué déjà présent dans la plante auparavant. De plus, la répartition de l'azote nouvellement absorbé pendant les 7 jours (azote marqué) entre les différents organes peut être calculée pour un traitement donné.

**Pour les expérimentations réalisées en conditions contrôlées sur luzerne**, la méthode de marquage utilisée est dite "continue". En d'autres termes, le traceur isotopique étant apporté tout au long des expérimentations au niveau de la solution nutritive sous forme de  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  (Chapitre III) ou de  $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  (Chapitre IV), tout enrichissement en  $^{15}\text{N}$  dans un organe

## A Chapitre III

200 mg de pivot lyophilisé et broyé  
+ 200 mg de PVPP + 5 mL de tampon Imidazole-HCl  
+ 2 mM PMSF + 10 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol  
+ 0,01 % Triton X-100 (50 mM, pH 6,5)

VORTEX( 3x 30 secondes)

**CENTRIFUGATION**  
(3200 x g, 20 min, 4°C)

**CENTRIFUGATION**  
du surnageant  
(12000 x g, 10 min, 4°C)

**SURNAGEANT**

1 mL de surnageant

**PRECIPITATION des PROTEINES SOLUBLES**

Déoxycholate de sodium (0,015 %, 10 min, 20°C)  
TCA (7,2 %, 1 nuit, 4°C)

**CENTRIFUGATION**  
(12000 x g, 15 min, 4°C)

**CULOT PROTEIQUE**

Dosage Bradford des protéines solubles, SDS-PAGE,  
Western-blot (Chapitre III) et Immunodétection des VSP

## B Chapitre IV

300 mg de pivot lyophilisé et broyé  
+ 5 mL de tampon Sodium Phosphate  
+ 10  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoéthanol  
(100 mM, pH 7)

VORTEX( 3x 30 secondes)

**CENTRIFUGATION**  
(3200 x g, 20 min, 4°C)

Ré-extraction dans 5 mL de tampon  
Sodium Phosphate 100 mM, pH 7

**CENTRIFUGATION**  
(3200 x g, 20 min, 4°C)

Aliquotes de 1 mL  
pour dosage  
des protéines solubles  
(Bradford)(Chapitre IV)  
et VSP par ELISA

**Figure II-6** : Protocole d'extraction des protéines hydrosolubles du pivot de luzerne (A) Chapitre III (d'après Avice *et al.*, 1996a) et (B) Chapitre IV (d'après Cunningham et Volenec, 1998) .

donné correspond à une entrée d'azote issu de l'absorption. A partir de la détermination de l'abondance en  $^{15}\text{N}$  d'un organe, on peut donc calculer la quantité d'azote absorbé (en utilisant les équations développées ci-après), puis il est possible d'en déduire l'azote préexistant (c'est-à-dire déjà présent au premier jour de traitement T0).

Le pourcentage d'azote issu de l'absorption  $N_{\text{abs}}$  est donc :

$$\% N_{\text{abs}} = (E_{N_{\text{éch}}} / E_{N_{\text{SN}}}) \times 100$$

avec  $E_{N_{\text{éch}}}$  = excès isotopique de l'échantillon

$E_{N_{\text{SN}}}$  = excès isotopique de la solution nutritive

La quantité d'azote par plante issue de l'absorption  $qN_{\text{abs}}$  correspond à :

$$qN_{\text{abs}} = (qN_{\text{tot}} \times \% N_{\text{abs}}) / 100$$

Le pourcentage d'azote préexistant  $N_{\text{p}}$  se déduit de :

$$\% N_{\text{p}} = 100 - \% N_{\text{abs}}$$

et en quantité :

$$qN_{\text{p}} = qN_{\text{tot}} - qN_{\text{abs}}$$

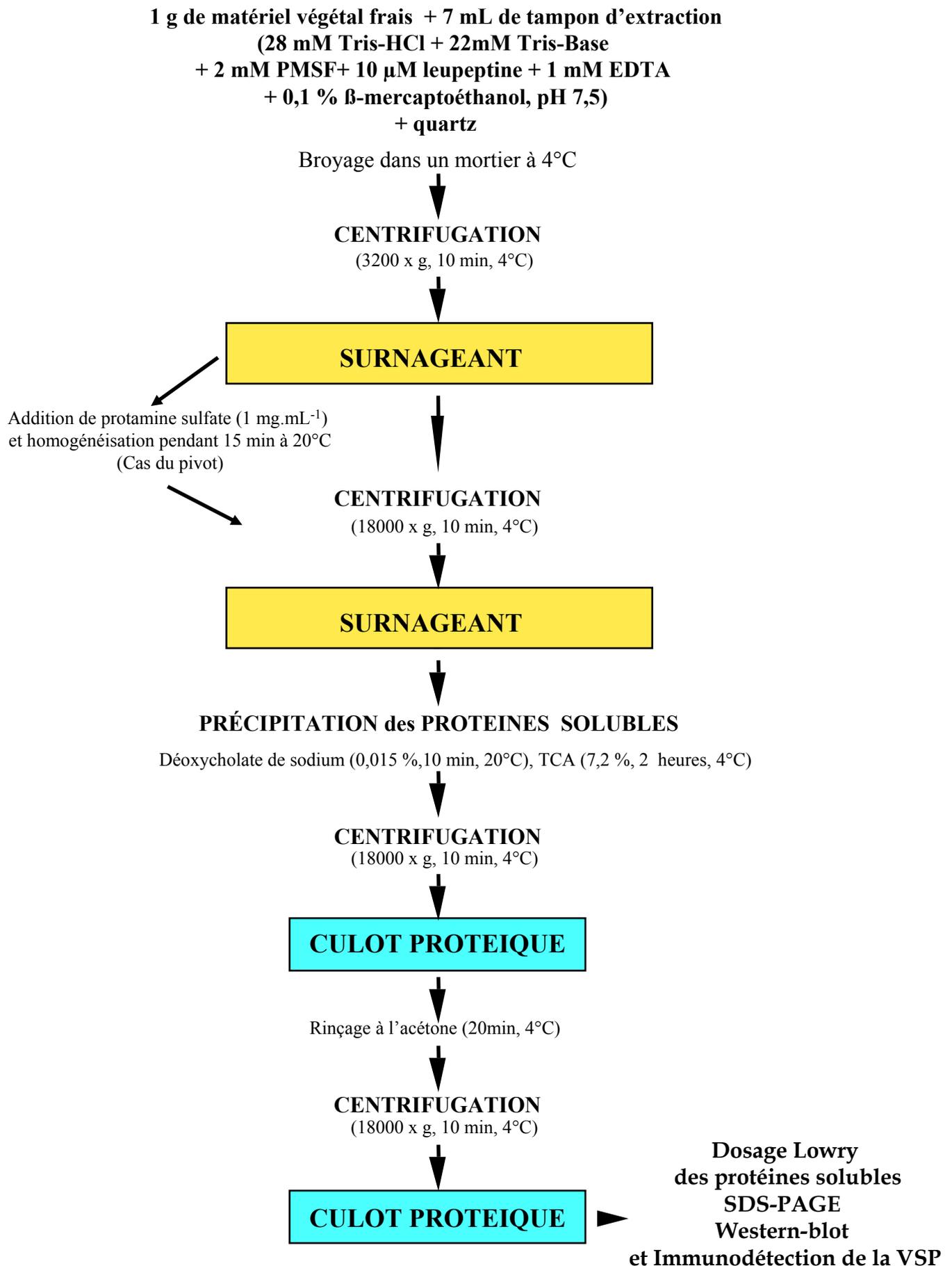
## **II-B- Dosage et analyse électrophorétique des protéines solubles et des VSP**

### **II-B-1- Extraction des protéines solubles**

#### **II-B-1-a- A partir de matériel végétal lyophilisé chez la luzerne (Chapitre III et IV)**

Les protéines solubles du pivot de luzerne sont extraites selon deux méthodes. Au cours de l'expérimentation développée dans le Chapitre III, elles sont obtenues à 4°C à partir de 200 mg de poudre lyophilisée et finement broyée (Figure II-6A) en présence de 5 mL de tampon Imidazole-HCl (50 mM ; pH 6,5) contenant 2mM de phényl méthyl-sulfonyl fluoride (PMSF), 10 mM de  $\beta$ -mercaptoéthanol, 0,01 % (v/v) de Triton X-100 et 200 mg de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). L'addition de PVPP permet de fixer les polyphénols végétaux qui pourraient interférer lors du dosage colorimétrique des protéines. Le PMSF, (inhibiteur irréversible des protéases à sérine), permet de minimiser les risques de protéolyse et la présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol stabilise les liaisons protéiques SH (Avicé *et al.*, 1996a). Après centrifugation (3200 x g, 20 minutes à 4°C), le surnageant obtenu est centrifugé 2 fois consécutivement à 12000 x g pendant 10 minutes à 4°C.

Les protéines solubles du pivot de luzerne de l'expérimentation I du Chapitre IV sont extraites à 4°C à partir de 300 mg de poudre lyophilisée et finement broyée en présence de 5



**Figure II-7 :** Protocole d'extraction des protéines hydrosolubles des différents organes du colza (Rossato *et al.*, 2001).

mL de tampon d'extraction (Sodium Phosphate à 100 mM ;  $\beta$ -mercaptoéthanol à 10  $\mu$ M ; pH 7 ; 4°C) selon le protocole décrit par Cunningham et Volenec (1998, Figure II-6B). Les échantillons sont vortexés 3x30 secondes puis centrifugés (3200 x g, 20 minutes, 4°C). Le surnageant est récupéré et le culot obtenu est à nouveau extrait dans 5 mL de tampon d'extraction en vortexant 3x30 secondes. Après centrifugation (3200 x g, 20 minutes, 4°C), le surnageant obtenu est poolé au précédent et constitue l'extrait protéique soluble.

Ensuite, quelle que soit la méthode utilisée, une aliquote de 1 mL de l'extrait protéique soluble est prélevée pour le dosage des protéines solubles par la méthode de Bradford (Chapitre IV) et le dosage des VSP par méthode ELISA (protocole décrit dans le § II-C). Les protéines présentes dans le surnageant sont précipitées selon la méthode décrite par Peterson (1983), en ajoutant du déoxycholate de sodium (concentration finale 0,015 % ; 10 minutes à température ambiante) suivi de l'addition d'acide trichloroacétique (concentration finale 7,2 % ; une nuit à 4°C). Après centrifugation (12000 x g, 10 minutes à 4°C), le surnageant est éliminé et le culot protéique est séché sous hotte puis, conservé à -80°C avant dosage protéique par la méthode de Bradford (Chapitre III) et analyse ultérieure par électrophorèse (Figure II-6).

#### **II-B-1-b- A partir de matériel végétal frais chez le colza (Chapitre V)**

Les protéines solubles des différents organes du colza sont extraites à 4°C à partir de 1g de matière fraîche (Figure II-7). Après addition de 7 mL de tampon d'extraction (28 mM Tris-HCl ; 22 mM Tris-Base ; pH = 7,5) contenant 0,1 % (v/v) de  $\beta$ -mercaptoéthanol, 10  $\mu$ M de leupeptine, 2 mM de PMSF et 1 mM d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA), le tissu végétal est broyé dans un mortier en présence de quartz (Rossato *et al.*, 2001). L'addition de leupeptine (inhibiteur réversible des protéases à sérine et à cystéine) et de PMSF permet de minimiser les risques de protéolyse et la présence d'EDTA inhibe les métalloprotéases. Après centrifugation (3200 x g, 10 minutes à 4°C), le surnageant obtenu est additionné de protamine sulfate (1 mg.mL<sup>-1</sup>) afin d'éliminer les acides nucléiques qui provoquent un bruit de fond important sur les gels d'électrophorèse colorés au nitrate d'argent. Toutefois, l'emploi de protamine sulfate lors de l'extraction modifie le profil électrophorétique des protéines des feuilles et de la hampe. Il provoque une diminution de l'accumulation de la RubisCO, cette dernière étant probablement éliminée avec les acides nucléiques (Rossato, 2000). Le reste des profils électrophorétiques n'est pas modifié par la protamine sulfate. Ainsi, l'élimination de l'étape d'incubation avec la protamine sulfate permettra de suivre, dans les feuilles et la hampe, l'évolution des 2 sous-unités de 15 et 55 kDa de la RubisCO. Après homogénéisation pendant 15 minutes à température ambiante, le mélange est centrifugé à 18000 x g pendant 10 minutes à 4°C. Les protéines présentes dans le surnageant sont précipitées selon la méthode décrite par Peterson (1983) et décrite ci-dessus pour la luzerne. Après centrifugation (18000 x g, 10 minutes à 4°C), le surnageant est éliminé et le culot protéique est rincé à l'acétone pendant 20 minutes à 4°C. Après

**Tableau II-II :** Composition du tampon de reprise des protéines de luzerne et de colza concentré 2 fois (d'après Laemmli, 1970).

Tampon Tris-Base (0,5 M, pH=6,8)	12,5 mL
Glycérol	10 mL
SDS à 10 % (p/v)	11,5 mL
DTT 100 mM	772 mg
Bleu de Bromophénol	50 mg
Eau ultra pure	16 mL

centrifugation (18000 x g, 10 minutes à 4°C), le surnageant est à nouveau éliminé et le culot protéique est séché sous hotte puis conservé à -80°C avant dosage protéique par la méthode de Lowry et analyse ultérieure par électrophorèse.

### **II-B-2- Dosage colorimétrique des protéines solubles**

Le dosage des protéines de la luzerne est effectué selon la méthode de Bradford (1976). A 100 µL du culot repris dans 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5) (Chapitre III) ou d'extrait de surnageant protéique (Chapitre IV) sont ajoutés 5 mL de réactif de Bradford (BIORAD) dilué 5 fois. La coloration se développe en 5 minutes et reste stable pendant une heure. L'absorbance est lue à 595 nm et la quantité de protéines est déterminée par référence à une courbe étalon, établie avec du sérum d'albumine bovine (BSA) préparée dans un tampon Imidazole-HCl (50 mM ; pH 6,5 ; Chapitre III) ou dans un tampon Sodium Phosphate (100 mM ; pH 7 ; Chapitre IV).

Le dosage des protéines du colza (Chapitre V) est effectué d'après la méthode de Lowry *et al.* (1951). Les culots protéiques sont d'abord resolubilisés dans 100 µL de NaOH (1 N) puis dilués 10 fois par addition d'eau ultra pure. A 300 µL d'extrait protéique sont ajoutés 3 mL de réactif C. Le réactif C est un mélange de 25 mL de réactif A (2 g de carbonate de sodium dissous dans 100 mL de NaOH 1 N) et de 0,5 mL de réactif B (1 g de tartrate de sodium et 0,5 g de sulfate de cuivre dissous dans 100 mL d'eau ultra pure). Après 10 minutes d'incubation de l'extrait protéique à température ambiante avec le réactif C, 300 µL de réactif de Folin (1 N, SIGMA) sont ajoutés au mélange. La coloration bleue se développe en 30 minutes et reste stable pendant au moins une heure. L'absorbance est lue à 640 nm et la quantité de protéines est déterminée par référence à une courbe étalon, établie avec du BSA préparé dans du NaOH (0,1 N).

### **II-B-3- Electrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE)**

Ce type d'électrophorèse réalisé en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS) permet de séparer des protéines selon leur taille. Les molécules de SDS masquent les charges propres des protéines et leur confèrent alors une charge négative. Au cours de l'électrophorèse, la migration des polypeptides s'effectue sous l'influence d'un champ électrique et leur séparation en fonction du poids moléculaire est réalisée par le maillage du gel de polyacrylamide

**Tableau II-III :** Préparation et composition du gel de concentration à 5,5% de Duracryl pour l'électrophorèse en SDS-PAGE (volumes pour 2 gels).

Duracryl	3 mL
Tampon Tris-Base (0,5 M, pH=6,8)	4 mL
Eau ultra pure	8,6 mL
<i>Dégazer 5 minutes sous hotte</i>	
APS à 10 %	92 µL
Temed	22 µL
Polymérisation en 20 minutes	

**Tableau II-IV :** Préparation et composition du gel de séparation à 15% de Duracryl pour l'électrophorèse en SDS-PAGE (volumes pour 2 gels).

Duracryl	12,2 mL
Tampon Tris-Base (1,5 M, pH=8,8)	6,25 mL
Eau ultra pure	6,3 mL
<i>Dégazer 10 minutes sous hotte</i>	
SDS à 10 % (p/v)	250 µL
<i>Laisser 10 minutes à 30°C</i>	
APS à 10 %	62,5 µL
Temed	12,5 µL
Polymérisation en 1 heure	

**Tableau II-V :** Etapes de la révélation des protéines séparées en SDS-PAGE par la coloration argentique.

Etapes	Solutions	Durée de traitement
Fixation	Méthanol 50 % (v/v)	au moins 2 heures
	Acide acétique glacial 10 % (v/v)	
Lavages	Eau ultra pure	3 fois 20 minutes
Pré-traitement	DTT 5 mg.L <sup>-1</sup>	30 minutes
Imprégnation	Nitrate d'argent 2 g.L <sup>-1</sup>	30 minutes
Rinçage	Eau ultra pure	5 minutes
Révélation	Sodium carbonate 35 g.L <sup>-1</sup>	5 à 10 minutes
	Formaldéhyde 0,033 % (v/v)	
Arrêt	Acide acétique glacial 3 %	5 minutes

### **II-B-3-a- Préparation des échantillons**

Les culots protéiques de pivot obtenus après précipitation au TCA (Figure II-6 et II-7) sont d'abord resolubilisés dans 1/2 volume d'eau ultra pure, puis dans 1/2 volume de tampon de reprise (Laemmli, 1970) concentré 2 fois (Tableau II-II), de façon à obtenir 10  $\mu\text{g. } \mu\text{L}^{-1}$  de protéines pour la luzerne et 0,37  $\mu\text{g. } \mu\text{L}^{-1}$  de protéines pour le colza. Une dénaturation à 100°C pendant 5 minutes est effectuée suivie d'une centrifugation (12000 x g, 5 minutes, microcentrifugeuse BECKMAN) pour éliminer les autres molécules (sucres, polyphénols...). Pour la luzerne, 50 et 150  $\mu\text{g}$  de protéines et pour le colza, 3,4  $\mu\text{g}$  ou 13,6  $\mu\text{g}$  sont déposés par puits pour le western blotting et analyse en SDS-PAGE respectivement.

### **II-B-3-b- Préparation des gels et conditions de migration**

La séparation des protéines solubles en fonction de leur poids moléculaire (SDS-PAGE) est réalisée sur des gels verticaux coulés entre des plaques de verre 10x10x0,08cm (système OWL). La concentration en Duracryl (polymère d'acrylamide modifié à résistance mécanique élevée, COGER) est de 5,5 % pour le gel de concentration et de 15 % pour le gel de séparation. La composition de ces 2 types de gels est indiquée dans les tableaux II-III et II-IV. La solution d'ammonium persulfate (APS) et le TEMED permettent respectivement d'initier et de catalyser la polymérisation des gels. L'électrophorèse s'effectue dans un tampon de migration TRIS/SDS/Glycine (25 mM/0,1 %/192 mM ; pH 8,8 ; Laemmli, 1970). La migration dure environ 2 heures (100 mA, 150 V pour la luzerne et 75 mA, 200 V pour le colza) à une température maintenue à 15°C et elle est arrêtée lorsque le bleu de bromophénol, utilisé comme marqueur de front de migration, arrive à la base des gels.

### **II-B-3-c- Révélation des protéines par coloration**

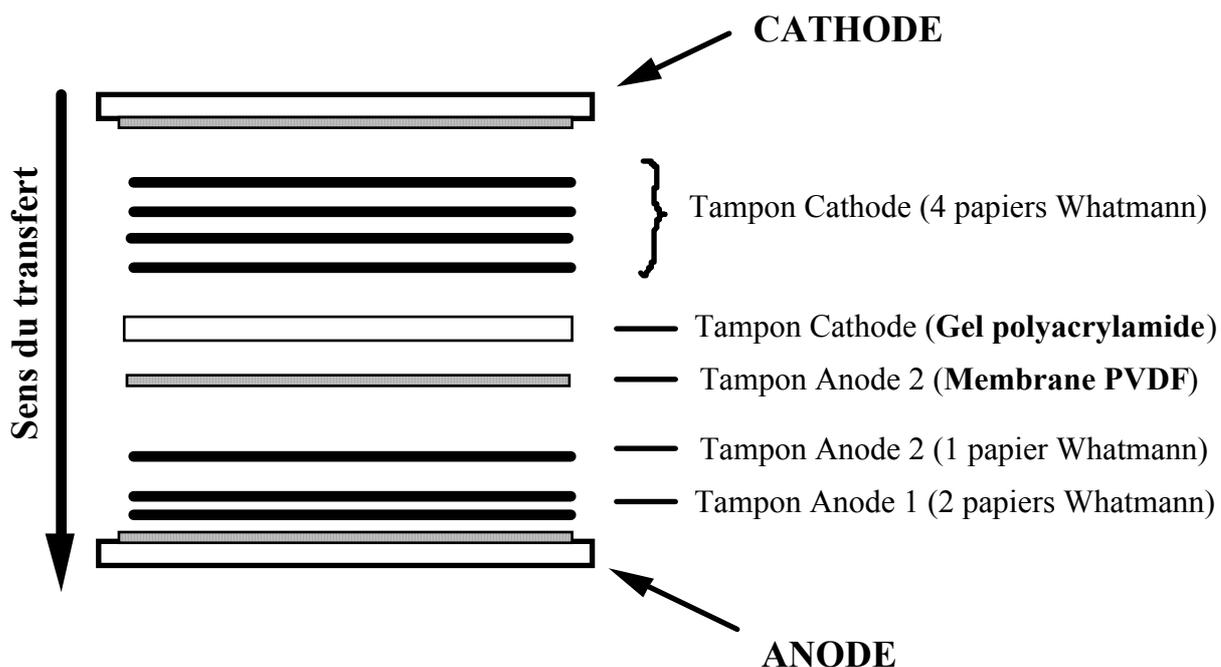
#### ***-au Bleu de Coomassie chez la luzerne (Chapitre III)***

A l'issue de l'électrophorèse, les gels sont incubés pendant 2 heures dans un bain colorant à 0,25 % (p/v) de Bleu de Coomassie R-250 préparé dans 45 % (v/v) de méthanol et 10 % (v/v) d'acide acétique. Le gel est ensuite décoloré dans une première solution (méthanol 50 %, acide acétique 7 %) puis dans un deuxième décolorant (éthanol 7 %, acide acétique 5 %).

#### ***-au nitrate d'argent chez le colza (Chapitre V)***

Les protéines séparées par électrophorèse sont révélées par coloration au nitrate d'argent. Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau ultra pure (Tableau II-V).

**Fixation des protéines :** cette étape permet la précipitation des protéines dans la matrice du gel, les rendant insolubles.



**Figure II-8 :** Dispositif mis en place lors du transfert électrophorétique des protéines du gel de polyacrylamide vers la membrane de PVDF (système électrophorétique semi-sec, Millipore).

**Tableau II-VI :** Composition des tampons utilisés lors du transfert des protéines (Western Blotting).

Produit	Tampon Anode 1	Tampon Anode 2	Tampon Cathode
Tris-Base	0,3 M	0,025 M	0,025 M
SDS	0,1 %	0,1 %	0,1 %
Méthanol	35 %	35 %	20 %
Glycine			0,04 M
pH	10,4	10,4	9,4

**Prétraitement des gels par le dithiothréitol (DTT)** : il permet de stabiliser les groupements SH des protéines, ce qui favorise l'imprégnation par le nitrate d'argent.

**Imprégnation argentique** : elle s'opère dans une solution de nitrate d'argent. L'excès est éliminé par un lavage à l'eau ultra pure.

**Révélation par le carbonate de sodium** : elle constitue l'étape la plus délicate de la technique. La durée de la révélation est variable selon l'intensité de la coloration souhaitée et elle doit être appréciée par l'expérimentateur. La solution de carbonate de sodium contient du formaldéhyde indispensable au contraste de la coloration. La réaction est arrêtée par immersion des gels dans une solution d'acide acétique qui fixe la coloration.

#### **II-B-3-d- Analyse des profils électrophorétiques**

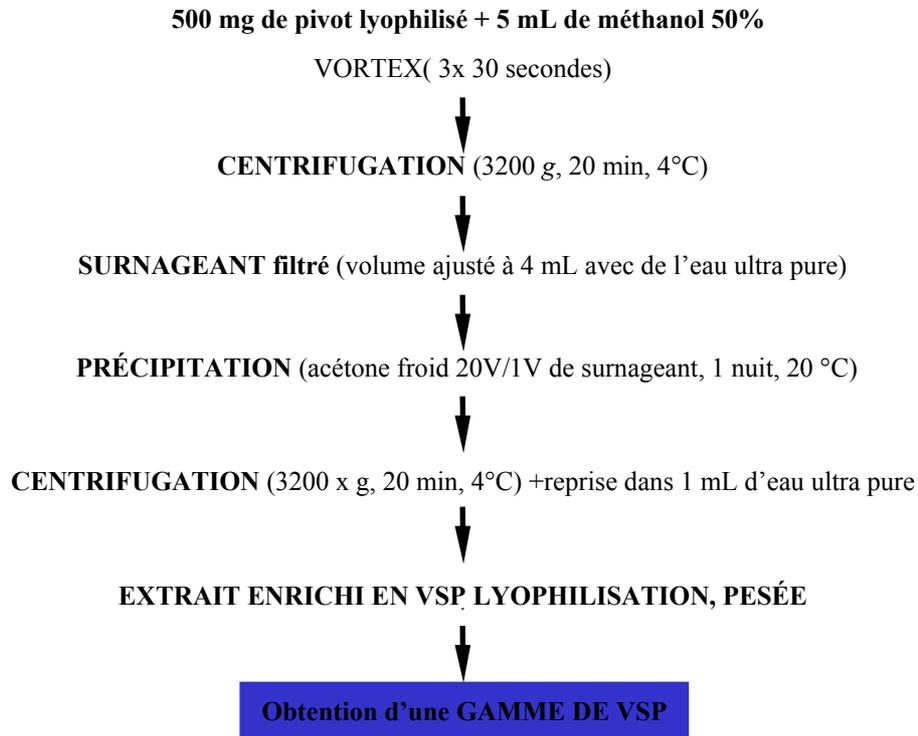
L'analyse des données fournies par les gels d'électrophorèse est effectuée grâce à un système informatique de traitement de l'image (système Bioimage de Millipore ; BioCapt et logiciel Bio-1D de Vilert-Lourmat). Elle comporte plusieurs étapes : acquisition de l'image, détection des bandes polypeptidiques, appariement des spots ou bandes homologues entre les différentes pistes d'un gel ou entre les différents gels d'une série et exploitation des résultats (Damerval *et al.*, 1993).

#### **II-B-4- Transfert sur membrane PVDF ("western blotting") et immunodétection des VSP**

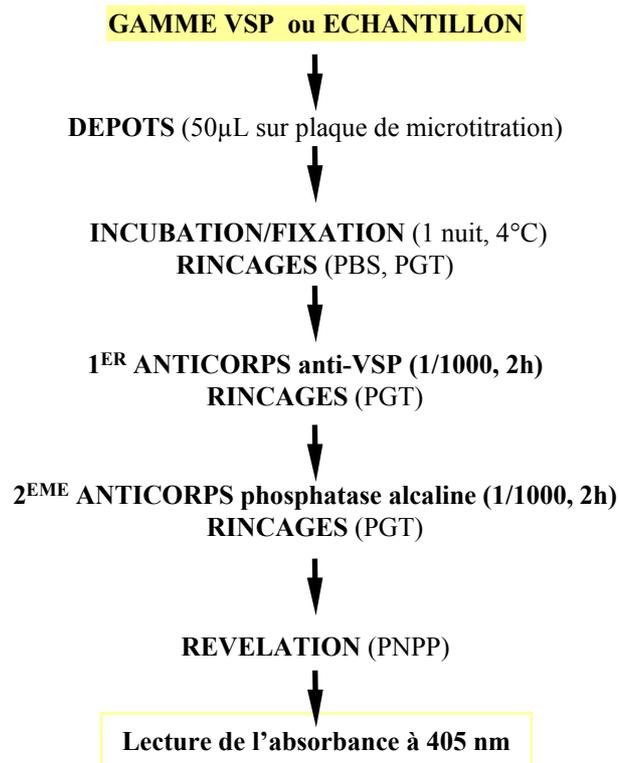
##### **II-B-4-a- Transfert électrophorétique des protéines sur PVDF ("western blotting")**

Après séparation de l'extrait protéique par SDS-PAGE, le transfert des protéines du gel de polyacrylamide vers une membrane de polyvinylidène difluoride (Immobilon-PVDF, COGER) est effectué. Ce transfert électrophorétique "semi-sec" est réalisé avec le système de transfert en graphite de MILLIPORE (milliblot-graphite electroblotter system) (Figure II-8). Trois tampons sont utilisés lors du transfert : Anode 1, Anode 2, Cathode (Tableau II-VI) selon le protocole décrit par Towbin *et al.* (1979) modifié par Avice *et al.* (1997b).

Le gel SDS-PAGE utilisé est équilibré pendant 20 minutes dans le tampon Cathode. La membrane de PVDF est plongée pendant 15 secondes dans du méthanol à 100 % puis pendant 10 minutes dans de l'eau ultra pure avant d'être équilibrée dans le tampon Anode 2. Des feuilles de papier Whatmann 3 MM de même taille que le gel et la membrane de transfert sont utilisées pour réaliser le "sandwich de transfert" (Figure II-8).



**Figure II-9** : Protocole de purification partielle des VSP d'après Barber *et al.* (1996).



**Figure II-10** : Protocole de dosage des VSP par test ELISA.

## **II-B-4-b- Révélation immunologique des VSP de 32, 19 et 15 kDa chez la luzerne et 23 kDa chez le colza**

Les anticorps anti-VSP de luzerne sont fournis par l'équipe du Professeur Volenec (Université de Purdue, USA) et leur production est décrite par Cunningham et Volenec (1996). La production des anticorps dirigés contre la protéine de 23kDa est décrite par Rossato *et al.* (2002a). Au terme du western blotting (20 minutes ; 100 V ; 2,5 mA.cm<sup>-2</sup>) la membrane de PVDF est lavée 3 fois 10 minutes en milieu salin dans du tampon TBST (Tris-base 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 à 0,15 % (v/v) ; pH 8). Ce tampon TBST permet de bloquer les sites de fixation non spécifiques des protéines sur la membrane de PVDF. La membrane est alors incubée pendant 2 heures dans le premier anticorps (anticorps polyclonaux de lapin anti-32, ou 19 kDa dilués au 1/10000 ; anticorps polyclonaux de lapin anti-15 kDa dilués au 1/20000 ; anticorps polyclonaux de lapin anti-23kDa dilués au 1/1000) préparé dans le TBST. Les anticorps non fixés sont éliminés par 5 lavages successifs avec le TBST. La feuille de PVDF est ensuite incubée durant 2 heures avec des anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplés à la phosphatase alcaline (dilution 1/12000 pour la luzerne et dilution 1/3000 pour le colza, BIORAD).

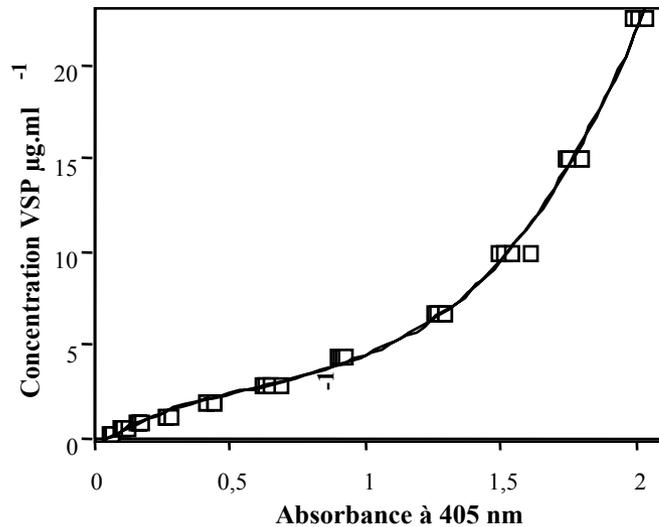
Après des lavages dans le TBST puis dans le TBS (Tris-base 10 mM ; NaCl 150 mM ; pH 8), la localisation des complexes antigène-anticorps est visualisée grâce au développement de la coloration produite par l'activité de la phosphatase alcaline (Blake *et al.*, 1984) en présence de ses 2 substrats : le NBT (p-nitro blue tetrazolium chloride) et le BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate p-toluidine salt) (BIORAD) préparés dans un tampon de révélation (Tris-HCl 100 mM ; NaCl 100 mM ; MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 5 mM ; pH 9,5) au moment de son utilisation.

Le complexe antigène-anticorps est visualisé entre 5 et 10 minutes suivant la sensibilité de la réaction. Après révélation, la réaction est arrêtée par 2 lavages dans l'eau osmosée.

## **II-C- Mise au point d'une méthode de dosage des VSP de luzerne par ELISA**

### **II-C-1- Obtention d'une gamme de VSP**

Grâce au protocole établi par Barber *et al.* (1996), il est possible de séparer rapidement les VSP (32, 19, 15 kDa et la  $\beta$ -amylase à 57 kDa) des autres protéines solubles présentes dans le pivot de luzerne. Cependant, dans le but d'obtenir un extrait fortement enrichi en VSP de 32, 19 et 15 kDa seulement, nous avons pris la précaution d'utiliser des poudres lyophilisées de pivots dans lesquelles la  $\beta$ -amylase était très faiblement représentée. Des contrôles pour vérifier l'absence de  $\beta$ -amylase et le degré de pureté de l'extrait de VSP ont été effectués par SDS-PAGE.



**Figure II-11** : Gamme étalon de VSP obtenue par test ELISA (abs : absorbance mesurée à 405 nm).  $VSP (\mu\text{g.ml}^{-1}) = 5,304 (\text{abs})^3 - 9,544(\text{abs})^2 + 9,067 (\text{abs}) - 0,325$ , avec  $R^2 = 0,995$

**Tableau II-VII** : Comparaison du pourcentage de VSP par rapport aux protéines solubles totales déterminées par le test ELISA et en SDS-PAGE (analyse par Bioimage) pour deux traitements de l'expérimentation du Chapitre III (gel SDS-PAGE, Figure III-4A) : le témoin à T0 et après 35 jours (LD : T0 + 35 jours) en héméroperiode longue. Les pourcentages déterminés par ELISA correspondent à la moyenne  $\pm$  l'écart-type pour  $n = 3$ .

% de VSP par rapport aux protéines solubles totales			
T0		T0+35	
ELISA	BIOIMAGE	ELISA	BIOIMAGE
14 $\pm$ 6,3	11,9	23,3 $\pm$ 3,9	31,5

Les VSP sont partiellement purifiées à partir de 500 mg de poudre lyophilisée de pivot dans 5 mL de méthanol à 50 % (Figure II-9). Le surnageant obtenu après centrifugation (3200 x g, 20 minutes, 4°C), contient les VSP de 15, 19 et 32 kDa. Ce surnageant est précipité à l'acétone froid (20 volumes pour 1 volume de surnageant, 1 nuit, -20°C) puis centrifugé (3200 x g, 20 minutes, 4°C). Le culot de VSP ainsi obtenu est repris dans 1 mL d'eau ultra pure. Après congélation, l'extrait enrichi en VSP est lyophilisé. Le poids est déterminé par simple différence de pesée avant et après la lyophilisation (Figure II-9). Après reprise dans 1 mL d'eau ultra pure, les échantillons ainsi obtenus sont utilisés pour préparer une gamme par dilutions successives dans du tampon de fixation (bicarbonate 0,1 M ; pH 9,6) en vue du dosage immunochimique (ELISA).

### **II-C-2- Dosage ELISA sur microplaque**

Le test ELISA (Figure II-10) est réalisé sur une plaque de microtitration (microplaque DYNEX). Les dépôts de la gamme étalon ou des échantillons à doser - correspondant au surnageant obtenu après extraction des protéines hydrosolubles (Figure II-6) - sont de 50 µL par puits. Après une nuit d'incubation, on procède à plusieurs rinçages au PBS (NaCl 150 mM ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16 mM ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8 mM ; pH 7,2) et au PGT (PBS contenant 0,3 % (p/v) de gélatine et 0,2 % (v/v) de Tween).

Des essais préliminaires ont permis d'établir que les conditions optimales de dosage sont les suivantes : les incubations avec les anticorps de lapin anti-VSP et avec l'anticorps de chèvre anti-lapin couplé à la phosphatase alcaline doivent se faire au titrage de 1/1000 durant 2h. Le développement de la coloration jaune correspondant à la présence de complexe antigène-anticorps se fait grâce au PNPP 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> (phosphate de *p*-nitrophényle, Boehringer) dans une solution de diéthanolamine à pH 9,8.

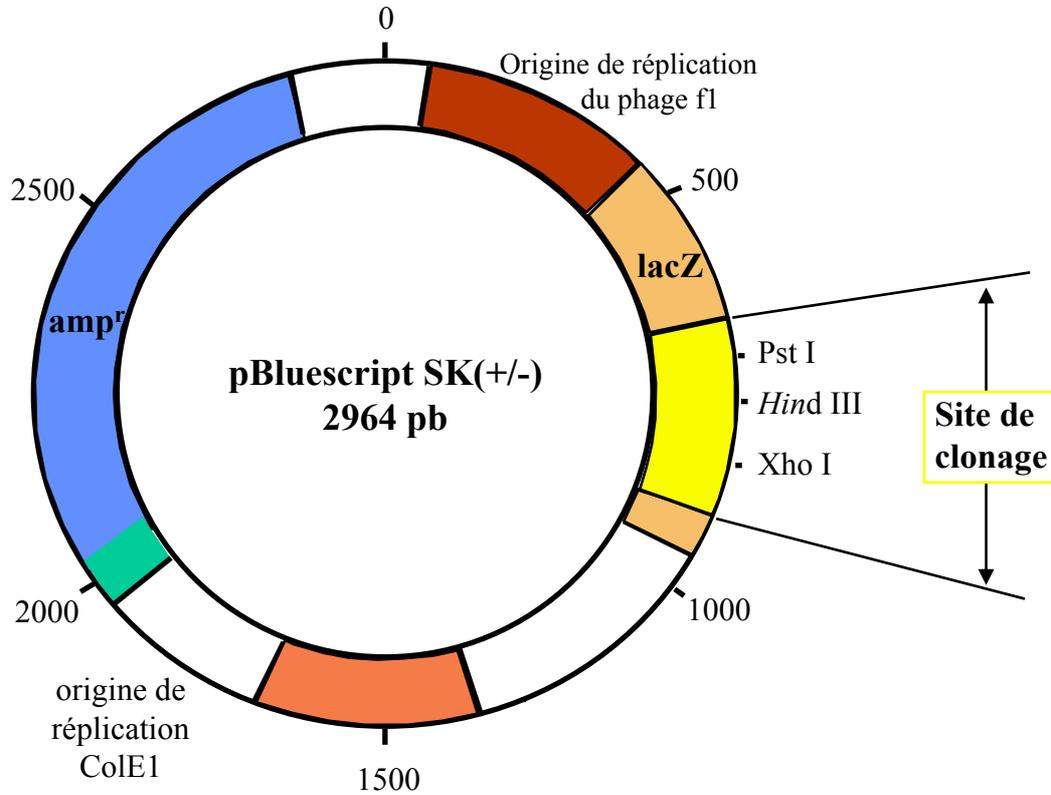
L'absorbance est suivie sur 30 minutes grâce à un lecteur de microplaque réglé à 405 nm. La réaction est stoppée par ajout de 100 µL de NaOH 0,5 M par puits.

La figure II-11 montre une relation hautement corrélée ( $R^2 = 0,995$ ) entre l'absorbance et une gamme de VSP comprise entre 0,39 µg.mL<sup>-1</sup> et 22,5 µg.mL<sup>-1</sup>.

### **II-C-3- Comparaison entre la méthode de dosage des VSP par ELISA et par SDS-PAGE**

Malgré les limites que montrent les techniques électrophorétiques (au niveau de la préparation, de la séparation et de la coloration des échantillons protéiques) ainsi que les méthodes d'analyse d'image (définition et identification délicate des bandes protéiques, mesure d'intensité intégrée difficile en présence d'un bruit de fond important...), il est possible d'estimer le niveau de représentation des VSP directement à partir d'un gel SDS-PAGE.

Nous avons donc comparé le pourcentage de VSP par rapport aux protéines solubles totales de deux traitements de l'expérimentation du Chapitre III (T0 et LD : 35 jours en



**Figure II-12** : Représentation schématique du vecteur de clonage pBluescript SK(+/-) et de ses principaux sites d'intérêt.

héméroperiode longue, Figure III-4A). Il a été déterminé par ELISA ou après analyse du profil électrophorétique en SDS-PAGE. On constate que le dosage ELISA des VSP grâce à une gamme établie à partir de VSP lyophilisées, donne des résultats assez proches de ceux obtenus par l'analyse d'image du gel SDS-PAGE (Tableau II-VII).

Le dosage des VSP par l'utilisation de techniques immunologiques (ELISA) offre l'avantage de déterminer aisément les teneurs en VSP à partir d'un extrait brut de protéines solubles et ceci sur un très grand nombre d'échantillons (96 dosages possibles par microplaque). Le gain de temps et la réduction du coût offerts par cette technique de dosage des VSP en font une méthode d'analyse quantitative intéressante qui a été utilisée dans les Chapitres III et IV.

## **II-D- Méthode d'analyse du niveau d'expression des transcrits 32 kDa et 57 kDa**

### **II-D-1- Transformation bactérienne et obtention des sondes 32 kDa et 57 kDa ( $\beta$ -amylase)**

Deux plasmides pBluescript SK (-) (Figure II-12) contenant un clone d'ADNc de la VSP de 32 kDa (*vsp 32* ; GenBank Accession AF530579) et un clone d'ADNc de  $\beta$ -amylase (*vsp 57* GenBank Accession AF026217) nous ont été fournis par l'équipe du Professeur Volenec (Université de Purdue, USA) sous forme lyophilisée. L'obtention et la caractérisation du clone de  $\beta$ -amylase (*vsp 57*) sont décrites par Gana *et al.* (1998).

La participation à l'isolement du clone d'ADNc de la *vsp 32* a fait l'objet d'un stage de 3 mois dans l'équipe du Professeur Volenec au printemps 2000 lors de ma 1<sup>ère</sup> année de thèse. Brièvement, le principe d'obtention de ce clone repose sur la construction d'une banque d'ADNc chez la variété dormante de luzerne Norsman. Cette banque a été criblée avec des sondes ADNc radioactives fabriquées à partir d'ARNm issus de pivots récoltés en Octobre, Novembre et Décembre sur deux années de culture. En effet, le niveau d'expression des VSP étant le plus élevé en automne, leurs transcrits sont supposés être majoritairement représentés à cette période. A partir de ces ARNm, les ADNc sont fabriqués et marqués au <sup>32</sup>P. Si les transcrits de VSP sont effectivement les plus abondants, les ADNc correspondants sont les plus marqués et constituent donc une sonde suffisamment spécifique. Tous les clones positifs issus du criblage primaire ont été isolés et l'ADN plasmidique amplifié et séquencé. Deux séquences ont présenté une forte homologie avec la VSP de 32 kDa et l'une d'entre elles (RN-T16) a été réutilisée en tant que sonde pour cribler de façon plus systématique la banque Norsman. Au cours de ce stage, les techniques de fabrication de sonde, clonage, amplification par PCR et excision des fragments d'intérêt à partir du vecteur phagique ont successivement permis l'isolement de ces clones et leur séquençage respectif (logiciel de séquençage DNAMAN).

**Tableau II-VIII : Composition du milieu LB (Luria Bertani).**

---

NaCl	10 g
Extrait de levure	5 g
Tryptone	15 g
Eau ultra pure qsp (pH ajusté à 7,5 avec NaOH 5N)	1 L
Agar (pour milieu solide)	20 g

---

### **II-D-1-a- Cellule hôte et vecteur de clonage**

La souche bactérienne d'*Escherichia coli* utilisée comme souche hôte est la souche XL1 blue MRF'. Le vecteur pBluescript SK(-) d'environ 3 Kb, commercialisé par la société Stratagene comprend, en suivant le sens de la transcription depuis l'origine de réplication Col E1 :

- le gène lacZ codant le fragment  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidase
- un site de clonage multiple comprenant notamment les sites de restriction *Hind* III, *Xho* I et *Pst* I
- l'origine de réplication du phage f1 permettant la réplication mono brin du gène lacZ
- le gène Amp<sup>r</sup> de résistance à l'ampicilline pour la sélection des bactéries transformées.

### **II-D-1-b- Transformation et sélection des clones recombinants**

Deux microlitres de plasmide lyophilisé pBS SK (-) sont utilisés pour la transformation de 40  $\mu$ L de bactéries XL1 blue électro-compétentes. La transformation des bactéries est effectuée à l'aide d'un électroporateur (*E. coli* pulser apparatus, Bio-Rad) dans des cuvettes de 2 mm. La décharge électrique délivrée est de 1,8 kV pendant 5 millisecondes. La sélection des bactéries transformées abritant un plasmide recombiné s'effectue sur des boîtes contenant un milieu LB (Tableau II-VIII) additionné d'Ampicilline (50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), préalablement étalées avec 30  $\mu$ L d'IPTG (isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactoside 100 mM) et 90  $\mu$ L d'X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside 100 mM) par le test d' $\alpha$  complémentation du gène lacZ. Si aucun gène n'est inséré au niveau du site de clonage multiple, le fragment du gène lacZ est exprimé. Il y a alors complémentation avec le fragment polypeptidique de la  $\beta$ -galactosidase synthétisé par la cellule hôte, générant une enzyme fonctionnelle qui donne une couleur bleue aux colonies en présence de Xgal et d'IPTG. Par contre, si un fragment d'ADN a été inséré au niveau du site de clonage multiple, l'enzyme n'est pas fonctionnelle et les bactéries sont blanches.

### **II-D-1-c- Purification des plasmides par lyse alcaline (mini-préparation)**

Les souches bactériennes contenant les plasmides d'intérêt sont ensemencées dans 5 mL de milieu de culture liquide LB additionné d'ampicilline (50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>). Ils sont cultivés à 37°C sous agitation (200 rpm) pendant une nuit. Un volume du milieu de culture (1,5 mL) est centrifugé à 13000 x g pendant 30 secondes puis le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 40  $\mu$ L de STET (0,1 M NaCl ; 10 mM Tris-HCl ; pH 8,0 ; 1 mM EDTA pH 8,0 ; 5 % Triton X-100) et 10  $\mu$ L de lysozyme (10 mg dans 1 mL Tris-HCl 10 mM). Le lysat est mis à bouillir pendant 60 secondes puis il est centrifugé à 13000 x g pendant 10 min. Le surnageant est prélevé et 2  $\mu$ L de ARNase y sont ajoutés. Le mélange est mis à incuber à 37°C pendant 30 min puis un volume d'isopropanol équivalent à celui du surnageant est ajouté, ce qui permet de précipiter l'ADN plasmidique. Le mélange est ensuite laissé 10 min à -20°C. Après une

nouvelle centrifugation pendant 10 min à 13000 x g, le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec 200 µL d'éthanol 70 %. Le mélange est de nouveau centrifugé à 13000 x g pendant 10 min. Une fois le surnageant éliminé, le culot est séché 5 min au concentrateur (Concentrator Eppendorf) puis il est repris dans 50 µL d'eau stérile avant d'être chauffé à 65°C pendant 5 min.

#### **II-D-1-d- Digestion enzymatique et marquage des sondes**

Le fragment d'intérêt est obtenu par digestion enzymatique du plasmide recombinant à l'aide des endonucléases de restriction *Hind* III pour la *vsp* 57 (Gana *et al.*, 1998) et *Xho* I et *Pst* I pour la *vsp* 32. Ces enzymes sont utilisées dans les conditions recommandées par les fournisseurs dans un volume réactionnel de 15 µL incubé au moins 1h 30 à 37°C. Après électrophorèse sur gel d'agarose 1 %, permettant de contrôler la taille attendue, les sondes *vsp* 57 (0,8 Kb) et *vsp* 32 (1,3 Kb) sont isolées et purifiées à partir du gel grâce au kit Qiagen (gel extraction kit). Elles sont ensuite marquées avec de l' $\alpha$   $^{32}$ P dCTP par random priming à l'aide du kit NEBlot (New England Biolabs) selon les instructions fournies par le fournisseur.

#### **II-D-2- Extraction des ARN totaux**

Les ARN totaux de l'expérimentation réalisée au Chapitre III sont extraits à partir de 2 g de pivot frais de luzerne (prélevés à 1 cm sous le collet). Les tissus sont broyés au mortier dans l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Le broyat est alors placé dans un tube Falcon stérile en présence de 0,4 g de PVPP et 8 mL de phénol équilibré et stabilisé (pH 7,6 à 8) avant de laisser l'ensemble dégeler rapidement par incubation à 65°C.

L'ajout de 8 mL de tampon d'extraction (sodium acétate 0,2 M ; pH 5,2 ; EDTA 0,01 M ; SDS 1 %) est suivi d'une incubation de 15 minutes à 65°C au cours de laquelle une agitation de 30 secondes au vortex est effectuée toutes les 2 minutes. Après une deuxième incubation de 15 minutes à 25°C, 8 mL de chloroforme sont ajoutés, et les tubes agités 10 minutes à température ambiante, sont ensuite centrifugés pendant 30 minutes à 18500 x g à 4°C. La phase supérieure aqueuse contenant l'ARN est reprise par un volume égal d'isopropanol. Une nouvelle centrifugation à 9000 x g et à 4°C pendant 20 minutes permet de précipiter l'ARN. Le culot d'ARN est alors successivement lavé avec 8 mL d'éthanol à 70 % puis centrifugé pendant 10 minutes à 9000 x g et 4°C et lavé deux fois avec 2 mL d'éthanol 70 % avant d'être repris dans 500 µL d'eau DEPC. Les ARN sont re-précipités toute une nuit à 4°C par un volume V/3 de LiCl 8 M et centrifugés (10 minutes à 12000 x g, 4°C). Après rinçage par de l'éthanol à 70 %, une nouvelle centrifugation est appliquée pendant 5 minutes à 12000 x g et 4°C avant la reprise du culot sec dans 250 µL d'eau DEPC.

Des essais préalables ont montré que la qualité des northern blots réalisés à partir d'ARN totaux extraits soit de matériel frais, soit de matériel lyophilisé, broyé et stocké à -80°C, était très comparable. Les ARN totaux des expérimentations I et II du Chapitre IV sont donc extraits

**Tableau II-IX :** Composition du tampon de pré-hybridation et d'hybridation.

SDS	7 %
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25 M
EDTA	2 mM
HEPARINE	0,2 mg.mL <sup>-1</sup>
ADN de thymus de veau	0,1 ng.mL <sup>-1</sup>

**Tableau II-X :** Composition des tampons et conditions de rinçage de la membrane après hybridation.

<b>COMPOSITION du TAMPON</b>	<b>TEMPERATURE et DUREE</b>
2X SSC, 0,1 % SDS	20°C, 5 minutes
2X SSC, 0,1 % SDS	55°C, 10 minutes
1X SSC, 0,1 % SDS	55°C, 10 minutes
0,2X SSC, 0,1 % SDS	55°C, 15 minutes

à partir de 300 mg de poudre lyophilisée de pivot de luzerne stockée à  $-80^{\circ}\text{C}$ . La poudre est placée dans un tube Nalgene stérile en présence de 0,2 g de PVPP et 4 mL de phénol équilibré et stabilisé (pH 7,6 à 8). L'ajout de 4 mL de tampon d'extraction (sodium acétate 0,2 M pH 5,2 ; EDTA 0,01 M ; SDS 1 %) est suivi d'une incubation de 15 min à  $65^{\circ}\text{C}$  au cours de laquelle les poudres sont agitées au vortex toutes les 2 minutes. Après 15 min d'incubation à  $25^{\circ}\text{C}$ , 4 mL de chloroforme sont ajoutés, et les tubes agités 10 min à température ambiante, sont ensuite centrifugés pendant 30 min à  $18500 \times g$  à  $4^{\circ}\text{C}$ . La phase supérieure aqueuse contenant l'ARN est récupérée et 4 mL de phénol/chloroforme/isoamylalcool 24 : 24 : 1 (v/v/v) y sont ajoutés. Après une nouvelle agitation de 10 min et une centrifugation à  $9000 \times g$  pendant 30 min à  $4^{\circ}\text{C}$ , la phase aqueuse est récupérée et une nouvelle extraction au chloroforme/isoamylalcool 24 : 1 (v/v) est réalisée. Après agitation et centrifugation, la phase aqueuse supérieure est précipitée pendant une nuit à  $4^{\circ}\text{C}$  avec un volume V/3 de LiCl 8 M. Le lendemain, le culot d'ARN est obtenu après centrifugation à  $12000 \times g$  pendant 30 min à  $4^{\circ}\text{C}$  puis il est lavé successivement avec 250  $\mu\text{L}$  de LiCl 2 M et d'éthanol 70 %. Après une nouvelle centrifugation à  $20000 \times g$  pendant 10 min à  $4^{\circ}\text{C}$ , le culot est repris dans 60  $\mu\text{L}$  d'eau DEPC puis il est à nouveau précipité à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant une nuit avec 1/10 (v/v) d'acétate de sodium 3 M pH 5,3 et 2,2 volumes d'éthanol 70 %. Le troisième jour, les culots sont repris dans 60  $\mu\text{L}$  d'eau DEPC après centrifugation ( $20000 \times g$ , 30 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) et purification à l'éthanol 70 %.

### **II-D-3- Quantification des acides nucléiques**

La quantification des acides nucléiques (ADN ou ARN) est réalisée au spectrophotomètre (GeneQuant II, Pharmacia Biotech) par mesure de l'absorbance à 260 nm. La présence de contaminants comme les protéines et/ou le phénol est décelée respectivement par la mesure de l'absorbance à 280 et 320 nm. Le rapport  $A_{260}/A_{280}$  compris entre 1,8 et 2 donne une indication sur la pureté de l'échantillon. Une unité d'absorbance à 260 nm correspond à une concentration de 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  pour de l'ADN double brin et de 40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  pour de l'ARN.

### **II-D-4- Northern blot et conditions d'hyridation**

Les ARN totaux extraits précédemment sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % dans un tampon MOPS 1X (acide 3-(N-morpholino) propane sulfonique 0,2 M ; acétate de sodium 3 M à pH 5,6 ; EDTA 0,5 M ; pH 8,0), en présence de formaldéhyde (conditions dénaturantes). La migration est effectuée à 70 V (100 mA). Les ARN totaux sont ensuite transférés par capillarité sur membrane de nylon (GeneScreen, NEN Life Science products) grâce à un tampon 10X SSC. Après fixation aux UV, les ARN sont ensuite hybridés avec la sonde *vsp57* (Chapitre III) ou successivement avec les 2 sondes d'intérêt (*vsp32* et *vsp57*, Chapitre IV). Les membranes sont d'abord pré-hybridées 2h à  $55^{\circ}\text{C}$  dans 25 mL de tampon de pré-hybridation (Tableau II-IX). La sonde est dénaturée 5 min à  $100^{\circ}\text{C}$  puis placée 5 min sur la glace, avant d'être ajoutée au tampon d'hybridation (tampon de pré-hybridation contenant la sonde marquée au  $^{32}\text{P}$ ). Après une nuit d'hybridation à  $55^{\circ}\text{C}$ , la membrane est rincée successivement dans des conditions de plus en plus stringentes présentées dans le Tableau II-X.

Elle est ensuite exposée contre un écran au phosphore durant 30 min à 1h, la lecture et la quantification du signal sont effectuées par un analyseur d'image de type Cyclone (PhosphorImager, Packard Instrument Compagny). Ensuite, un film autoradiographique (Kodak Biomax MS-1) est exposé contre la membrane puis révélé après 48h d'exposition.

Pour l'expérimentation du Chapitre III, la vérification du chargement égal entre pistes d'ARN se fait grâce à l'observation et la quantification sous UV des ARN totaux après traitement au bromure d'éthidium (OptiQuant software, Packard Instrument Compagny). Pour les expérimentations I et II du Chapitre IV, la vérification de l'homogénéité des dépôts d'ARN totaux effectués lors des northern blots ainsi que la correction des éventuels défauts de charge en ARN totaux se fait grâce à une déshybridation et à une nouvelle hybridation effectuée avec une sonde ARNr 18S de Pois (*Pisum sativum* L.).

### **II-E- Exploitation statistique des données**

L'expérimentation du Chapitre III est réalisée avec 3 ou 4 répétitions et les expérimentations des Chapitres IV et V avec 3 répétitions (chaque répétition comprenant 3 ou 4 plantes). Les données obtenues sont présentées sous forme de moyenne. La variabilité des résultats est donnée sous forme de la moyenne  $\pm$  l'écart-type de la moyenne pour  $n=3$  ou 4. Pour les analyses des northern blots ou des profils électrophorétiques (SDS-PAGE, Western blot), les résultats correspondent à la combinaison des extraits de 3 répétitions biologiques.

En complément, l'effet des différents traitements est étudié par analyse statistique et comparaison de moyennes (test T sur 2 groupes non appariés, Logiciel Statview student).

***CHAPITRE III : Effets des facteurs environnementaux et des signaux endogènes sur l'absorption d'azote, la répartition d'azote et l'accumulation de protéines de réserve des organes végétatifs chez Medicago sativa L. (article1)***

---

---

## **CHAPITRE III :**

# **EFFETS DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ET DES SIGNAUX ENDOGENES SUR L'ABSORPTION D'AZOTE, LA REPARTITION D'AZOTE ET L'ACCUMULATION DE PROTEINES DE RESERVE DES ORGANES VEGETATIFS CHEZ *MEDICAGO SATIVA* (Article1)**

---

**Effects of environmental factors and endogenous signals on N uptake, N partitioning and taproot vegetative storage protein accumulation in *Medicago sativa***

Running title: N partitioning and induction of VSPs in alfalfa

Carine Noquet<sup>A</sup>, Jean-Christophe Avice<sup>A</sup>, Alain Ourry<sup>A</sup>, Jeffrey J. Volenec<sup>B</sup>,  
Suzanne M. Cunningham<sup>B</sup> and Jean Boucaud<sup>A</sup>

***Australian Journal of Plant Physiology*, 28, 279-287, 2001.**

A-UMR INRA-UCBN 950 EVA et nutriments NCS, Institut de Recherche en Biologie Appliquée,  
Université, 14032 Caen Cedex, France.

B-Department of Agronomy, Purdue University, West Lafayette, IN 47907-1150, USA.

**Keywords :** *Medicago sativa* L., methyl jasmonate, N availability, N partitioning, regulation,  
short day, temperature, VSP accumulation.

## Abstract

Our objectives were to study the regulation of N partitioning within tissues of non-nodulated alfalfa (*Medicago sativa* L.) and N storage in taproots as vegetative storage proteins (VSP) of 15, 19, and 32 kDa and  $\beta$ -amylase (57 kDa) by environmental (photoperiod, temperature, N availability) and endogenous factors (methyl jasmonate). When compared to long-day conditions (LD, 16h day/8h night), short-day (SD, 8h day/16h night), exposure to low temperature (5°C) or application of methyl jasmonate (MeJA, 100  $\mu$ M) during 35 days reduced the biomass shoot/root ratio and modified the source-sink relationships for N. SD and MeJA treatments resulted in partitioning of N to taproots and a concomitant accumulation of VSPs. In comparison with LD, SD treatment also stimulated  $\beta$ -amylase gene expression 2.5 fold. Although low temperature increased the N partitioning to root tissues and the accumulation of soluble proteins in taproot, VSP concentration and  $\beta$ -amylase mRNA levels remained low. Increasing N concentration from 1 to 5 mM KNO<sub>3</sub> doubled the total dry matter but did not affect the N partitioning within the plant, VSP accumulation, or  $\beta$ -amylase expression. These results suggested that short photoperiod can result in preferential N allocation toward taproots with a concomitant induction of VSP accumulation.

## Résumé

Nos objectifs étaient d'étudier la régulation de i) la répartition d'azote entre organes chez la luzerne non nodulée (*Medicago sativa* L.) et ii) du stockage d'azote dans le pivot sous forme de protéines de réserve des organes végétatifs (VSP) de 15, 19, 32 kDa et de la  $\beta$ -amylase (57 kDa) sous l'effet de facteurs environnementaux (héméropériode, température, disponibilité en azote) et de facteurs endogènes (méthyl-jasmonate). Comparativement aux conditions de jours longs (LD, 16h de jour/8h de nuit), l'application de jours courts (SD, 8h de jour/16h de nuit), l'exposition aux basses températures (5°C) ou l'application de méthyl-jasmonate (MeJA, 100  $\mu$ M) pendant 35 jours réduisent le rapport biomasse aérienne/biomasse racinaire et modifient les relations source-puits pour l'azote. Les traitements jours courts et MeJA conduisent à une répartition de l'azote vers le pivot qui s'accompagne d'une accumulation de VSP. En comparaison avec les jours longs, le traitement jours courts augmente également l'expression du gène de la  $\beta$ -amylase d'un facteur 2,5. Bien que les basses températures favorisent la répartition de l'azote vers les organes racinaires et l'accumulation des protéines solubles dans le pivot, la teneur en VSP et les niveaux d'ARNm de la  $\beta$ -amylase restent bas. Une augmentation de la concentration en azote de 1 à 5 mM de KNO<sub>3</sub> multiplie par 2 la production de matière sèche totale mais n'affecte pas la répartition de l'azote au sein de la plante, ni l'accumulation de VSP ou l'expression de transcrits de la  $\beta$ -amylase. Ces résultats suggèrent que l'héméropériode courte peut conduire à une répartition préférentielle d'azote vers le pivot s'accompagnant d'une induction de l'accumulation de VSP.

## **I- INTRODUCTION**

During critical phases of growth such as grain filling, spring growth or regrowth following defoliation, many herbaceous and woody species are confronted with a transient limitation of C and N resources. In perennial forage plants such as alfalfa (*Medicago sativa* L.), photosynthetic activity and N acquisition as nitrate or ammonium (Kim *et al.*, 1993a ; Ourry *et al.*, 1994) or symbiotic fixation of N<sub>2</sub> (Vance and Heichel, 1981) are strongly reduced during early spring growth or post-cutting regrowth. Foliar regrowth requires mobilization of organic N and C reserves previously stored in roots and crowns (Hodgkinson, 1969). Recently, several studies have questioned the classical view that shoot regrowth of defoliated forages is carbohydrate-driven (for review see Volenec *et al.*, 1996). Studies based on pulse-chase labelling have suggested that the extensive loss of non-structural carbohydrates from alfalfa roots and crowns observed immediately after defoliation is primarily due to their utilization in respiration (Ta *et al.*, 1990 ; Avice *et al.*, 1996b). Using <sup>13</sup>C labelling of organic reserves Avice *et al.* (1996b) showed that up to 60 % of labeled C was used to support root respiration, while only 5% of the label was recovered in regrowing shoots after 30 days. This implies that very little C is mobilized from roots to shoots during regrowth. In contrast, <sup>15</sup>N labelling studies in alfalfa (Ourry *et al.*, 1994 ; Avice *et al.*, 1996b ; Barber *et al.*, 1996) have shown that endogenous N pools (mainly represented by taproot soluble proteins) were largely mobilized for post-cutting shoot regrowth. For example, 80% of N found in regrowing shoots is derived from mobilized root and crown N reserves 8 days following cutting (Avice *et al.*, 1996b).

Based on criteria given by Cyr and Bewley (1990), initial results obtained in lucerne by Hendershot and Volenec (1993a, b) were confirmed by subsequent studies (Avice *et al.*, 1996a ; Cunningham and Volenec, 1996) identifying three polypeptides (32, 19 and 15 kDa) in taproots. These polypeptides possess features consistent with those of a VSP. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis showed that these proteins were very abundant, representing up to 40% of total soluble proteins in taproots (Avice *et al.*, 1996a). In addition, these polypeptides showed a preferential pattern of mobilization / re-accumulation when shoot growth resumed after defoliation (Hendershot and Volenec, 1993b ; Avice *et al.*, 1996a) and in spring (Hendershot and Volenec, 1993a). After defoliation, the abundance of these proteins is substantially reduced (up to 84% for the 32 kDa VSP) during the first 6 days of shoot regrowth, while total soluble proteins in taproots declined only by 33% (Avice *et al.*, 1996a).

Cunningham and Volenec (1996) have clearly demonstrated using immunoblot analysis that these VSPs accumulate specifically in taproot tissue of perennial *Medicago*. Deposition of VSPs in roots begins about 50 days after planting in *Medicago sativa* cv. Europe (Avice, 1996 ; Kalengamaliro *et al.*, 1997), suggesting that expression of taproot VSP genes is developmentally

regulated. In all cases, accumulation of taproot VSPs was concomitant with starch deposition. Additional immunochemical studies localized these VSPs in vacuoles of parenchyma cells of wood rays and bark of lucerne (Avice *et al.*, 1996a). In addition,  $\beta$ -amylase accumulates to very high concentrations in alfalfa taproots (up to 8% of total soluble protein), and like the other VSPs, is used as a nitrogen source for regrowing shoots (Boyce and Volenec, 1992). Recently, these authors showed that defoliation reduced root starch levels and  $\beta$ -amylase content, the latter being associated with a very low steady-state  $\beta$ -amylase transcript abundance (Gana *et al.*, 1998). Cell suspension cultures provide additional evidence to suggest that  $\beta$ -amylase acts as a VSP in alfalfa taproots (Gana *et al.*, 1998).

Several studies, mostly in poplar (*Populus deltoides*) and soybean (*Glycine max* L. Merr.), suggested that environmental factors (daylength, temperature, N availability) and endogenous signals (soluble sugars, jasmonic acid) that modify N source-sink relationships within the plant also regulate VSP gene expression. In poplar, exposure to short-day treatments (8h day/16h night) significantly enhanced VSP gene expression and bark VSP content (Langheinrich and Tischner, 1991 ; Van Cleve and Apel, 1993). Similar results were observed when poplar was grown in long-day conditions with low temperatures (Van Cleve and Apel, 1993). Soil N availability and tissue N status also affect VSP accumulation. In soybean leaves (Staswick *et al.*, 1991) and poplar bark (Van Cleve and Apel, 1993), VSP transcript accumulation increased with N supply. During reproductive development of soybean, removal of pods modified N partitioning between source and sink tissues and induced VSP expression in young and mature leaves (Stephenson *et al.*, 1998). However, altering N nutrition had no significant effect on VSP accumulation in *Cichorium intybus* L. (Ameziane *et al.*, 1997).

Numerous studies on soybean clearly demonstrate that jasmonic acid (JA) and its derivative methyl esters such as methyl-jasmonate (MeJA) have a significant role in the regulation of VSP genes. Foliar treatment with low concentrations of MeJA rapidly increased VSP transcript level in soybean leaves (Anderson, 1988 ; Mason and Mullet, 1990 ; Staswick, 1990 ; 1992). In addition, expression of VSP genes in soybean leaves was enhanced by increased soluble sugar levels (Mason *et al.*, 1992), and repressed in the presence of auxin.

Surprisingly, little is known about signals involved in the regulation of VSP expression in alfalfa taproots. The aims of the present work are to determine how external or endogenous factors such as daylength (long days *vs* short days), low temperature, N availability and MeJA application alter N partitioning and VSP accumulation in alfalfa.

## II- MATERIALS AND METHODS

### II-A- Plant material and culture

Seeds of alfalfa (*Medicago sativa* L. cv. Europe) were germinated on a sand bench. After 15 days, when the primary trifoliolate leaves appeared, seedlings were transplanted to plastic pots filled with sterile sand and irrigated three times per week with a full nutrient solution. The nutrient solution was renewed every 5 d to prevent pH variation and contained, in mM, 0.4  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.0  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 3.0  $\text{CaCl}_2$ , 0.5  $\text{MgSO}_4$ , 0.15  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.2 Fe-Na EDTA ; and in  $\mu\text{M}$ , 14  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 5  $\text{MnSO}_4$ , 3  $\text{ZnSO}_4$ , 0.7  $\text{CuSO}_4$ , 0.7  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{21}$ , and 0.1  $\text{CoCl}_2$  (Kim *et al.*, 1991). Nitrogen was supplied (3 mM  $\text{KNO}_3$ ) to repress nodule formation. Plants were grown under greenhouse conditions with a thermoperiod of 20°C (day) and 18°C (night) and a photoperiod of 16h (day) and 8h (night). After 4 months, plants were defoliated 6 cm above crown level and transferred hydroponically on a continuously aerated nutrient solution in a 8 L plastic container. The composition of nutrient solution was identical to the above-described solution except that 1 mM  $\text{KNO}_3$  replaced 3 mM  $\text{KNO}_3$ .

### II-B- Influence of photoperiod, low temperature, high N and MeJA on N partitioning and VSP accumulation

Because the accumulation of storage compounds beginning approximately 10 d after defoliation (reserve mobilization 0-10 d, reserve accumulation 10-35 d, Kim *et al.*, 1993a ; Avice *et al.*, 1996a), the onset of treatments (**T0**) began 2 weeks after cutting. Plants were exposed to the following six treatments for 35 d: long-day photoperiod (**16h day/8h night**) at 20°C day/18°C night (**LD**) or 5°C day/5°C night (**LD/5°C**) ; short day photoperiod (**8h day/16h night**) at 20°C day/18°C night (**SD**) or 5°C day/5°C night (**SD/5°C**) ; high nitrogen (**High N**) or methyl jasmonate (**MeJA**) supply. High N and MeJA effects were studied by applying in the nutrient solution 5 mM  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  (2.5 atom  $^{15}\text{N}$  % excess) or 100  $\mu\text{M}$  MeJA (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) every 5 days, respectively. For High N and MeJA treatments, plants were submitted to LD conditions (photoperiod: 16h day-8h night, temperature: 20°C day/18°C night). For LD, LD/5°C, SD, SD/5°C and MeJA experiments, the nutrient solution contained 1 mM  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  (2.5 atom %  $^{15}\text{N}$  excess). In all experiments, light was supplemented with sodium high pressure lamps (phytoclaude 400 W) supplying approximately 400  $\mu\text{moles photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  15 cm above crown level.

### **II-C- Tissue sampling**

Plants were harvested the first day of treatment, *i.e.* two weeks after defoliation (**T0** = control plants) and 35 d later for all treatments. Harvested plants were separated into lateral roots, taproots, remaining leaves and stems in the crown (*i.e.* below leaves and stems present the first day of the experiment), and regrowing leaves and stems. Fresh weight of each sample was determined. Root samples were immediately frozen in liquid N<sub>2</sub>, keeping a subsample of 2 g for RNA extraction and  $\beta$ -amylase mRNA analyses. After freeze drying, root samples were ground and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  for N, protein, VSP quantification. Shoot tissues were dried at  $70^{\circ}\text{C}$  for 72h, ground to a fine powder, and stored under vacuum with desiccant for N analyses.

### **II-D- Protein extraction and analysis**

The method for protein analysis was adapted from Cunningham and Volenec (1996). Proteins were extracted by suspending 200 mg of ground, freeze-dried taproot at  $4^{\circ}\text{C}$  with 200 mg polyvinyl pyrrolidone in 5 ml of 50 mM imidazole-HCl buffer (pH 6.5) containing 2 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride, 10 mM 2-mercaptoethanol and  $100\ \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  Triton X-100. After centrifugation (3200 g,  $4^{\circ}\text{C}$  for 20 min), the supernatant was centrifuged twice at 12000 g at  $4^{\circ}\text{C}$  for 10 min. An aliquot of the resulting supernatant was used for VSP quantification by ELISA method (see details below). Protein extract (1 mL) was precipitated using the sodium deoxycholate-trichloroacetic acid protocol described by Peterson (1983). After centrifugation, pellet was air-dried and resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) for soluble protein measurement by protein dye-binding (Bradford, 1976) or resuspended in Laemmli lysis buffer (Laemmli, 1970) and boiled for 5 min to denature proteins. SDS-PAGE was performed as described by Laemmli (1970), using a  $150\ \text{g}\ \text{L}^{-1}$  acrylamide separation gel and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (Merril, 1990). Electrophoretic transfer of polypeptides from SDS-PAGE gels on to PVDF membrane (Immobilon-P, Proteigene, Saint-Marcel, France) was conducted by semi-dry electroblotting (2.5 mA for 20 min, Milli Blot system, Proteigene), according to the protocol described by Towbin *et al.* (1979). After blotting, PVDF membranes were treated with affinity purified polyclonal anti-VSP (15, 19 and 32 kDa ; dilution 1/10000) primary antibodies. The antigen-antibody complex was visualized with alkaline phosphatase linked to goat (*Ovis L.*) anti-rabbit (*Oryctolagus cuniculus L.*) IgG as described by Blake *et al.* (1984).

### **II-E- VSP quantification by ELISA and comparison with image analysis of SDS-PAGE**

In order to obtain highly enriched-VSP extracts (15, 19 and 32 kDa) without  $\beta$ -amylase contamination, we chose taproot samples with a very low level of  $\beta$ -amylase. Extraction of

enriched VSP was based on a methanol extraction previously described by Barber *et al.* (1996). Briefly, VSP were specifically extracted by suspending 1 g of lyophilized ground taproot powder in 10 mL of 50 % (v/v) methanol. After centrifugation (3200 g, 20 min at 4°C), supernatant containing VSP was separated in two equal volumes and then precipitated overnight with 50 µL of 3.6 mM sodium deoxycholate and 50 µL of 4.4 M trichloroacetic acid before centrifugation (10 000 g, 10 min, 4°C). One resulting pellet was resuspended in Laemmli lysis buffer for SDS-PAGE analysis to confirm the presence of VSP and the absence of β-amylase (data not shown). The other pellet was resuspended in 1 mL of ultra pure water, stored at -80°C and freeze-dried for determination of the amount of VSP by weight before and after lyophilization. This lyophilized pellet was prepared in fixation buffer (100 mM bicarbonate, pH 9.6) and was used to obtain different VSP concentrations needed for calibrating the ELISA results. Previous studies have shown that optimum results were obtained with VSP concentrations ranging from 0.4 µg mL<sup>-1</sup> to 10 µg mL<sup>-1</sup>. For the ELISA procedure, wells of the microplates (Dynex Technologies, Cergy-Pontoise, France) were coated overnight with 50 µL of enriched-VSP extract of different concentrations or unknown soluble protein extracts (diluted 100x in fixation buffer). After incubation, microplate was washed with PBS (150 mM NaCl, 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2) and blocking was performed with PBS containing 0.3 % gelatin (PGT). The incubations with rabbit anti-15, 19 and 32 kDa VSP antibodies and consequently with goat anti-rabbit alkaline phosphatase conjugate were performed at a dilution of 1/1000 for 2h. The antigen-antibody complex was visualized with addition of 0.5 mL L<sup>-1</sup> *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma) prepared in a buffer containing 97 mL L<sup>-1</sup> diethanolamine and 1 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 9.8). Optical density at 405 nm was measured on a microplate reader (Dynex) after 30 min of staining. A high coefficient of correlation was obtained ( $R^2 = 0.995$ ) with a linear relationship for a range of VSP concentrations between 0.4 and 10 µg mL<sup>-1</sup> (data not shown). Comparison between ELISA quantification and SDS-PAGE analysis (measurement of integrated intensity of protein bands by image gel analysis system) have shown that VSP quantification was not significantly different between either method.

#### **II-F- Analysis of β-amylase transcript level**

Total RNA was isolated using a modified procedure of Gana *et al.* (1998). RNA was extracted from 2 g of frozen taproot by grinding in liquid nitrogen. The resulting powder was transferred in a tube containing 0.4 g of PVPP and 8 mL of water-saturated phenol (65°C) and placed into a water bath (65°C). When samples thawed, 8 mL of RNA-extraction buffer (0.2M sodium acetate, pH 5.2, 0.01 M EDTA, 1 % SDS) was added to each tube, followed by incubation at 65°C for 15 min with 30 s vortexing every 2 min. After a 15 min incubation at

25°C, 8 mL of chloroform were added, and the tubes were shaken 10 min at room temperature. Agitation of tubes, centrifugation, and recovery of the RNA pellet were conducted as described by Ougham and Davies (1990).

For northern hybridization analysis, 5 µg of total RNA was separated on 1.5% agarose formaldehyde gels (Sambrook *et al.*, 1989) and transferred to nylon membranes (Gene Screen, NEN Life Science Products, Boston, MA, USA). The membrane was pre-hybridized (7% SDS, 0.25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA, 0.2 mg.mL<sup>-1</sup> heparine, 0.1 mg.mL<sup>-1</sup> calf thymus DNA) for 2 h at 55°C with slow shaking and then hybridized with a <sup>32</sup>P-labeled pMSBA1 β-amylase insert (GenBank Accession AFO26217) after RNA fixation in 10x SSC buffer (1.5 M NaCl, 0.15 M sodium citrate, pH 7) for 2 h at 80°C. The β-amylase insert in the pBluescript SK(-) vector was isolated by digestion with *Hind*III using an extraction kit (Quiagen, GmbH, Hilden, Germany) and was labeled with [<sup>32</sup>P]dCTP using random priming (Feinberg and Vogelstein, 1983) with NE blot (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). After denaturation (5 min at 100°C), β-amylase probe was placed on ice for 5 min and was then added to hybridization buffer (same composition as pre-hybridization buffer) for 24 h at 55°C. After hybridization, the membrane was rinsed with buffers as followed: 2x SSC, 0.1% SDS for 5 min at 20°C and 10 min at 55°C ; 1x SSC, 0.1% SDS for 10 min at 55°C and finally, 0.2x SSC, 0.1% SDS for 15 min at 55°C. The membrane was then exposed for 1 h using a phosphor screen, and signal intensities quantified using a PhosphorImager (Packard Cyclone storage phosphor system, Packard Instrument Company, Niles, IL, USA). In order to correct for RNA loading differences, the RNA stained with ethidium bromide was quantified under UV after gel separation (intensity analysis by OptiQuant software, Packard instrument Company) and were used for determination of β-amylase transcript levels. Membranes also were exposed to radiographic film at 25°C and developed as described by the manufacturer (Eastman Kodak Company, New York, NY, USA).

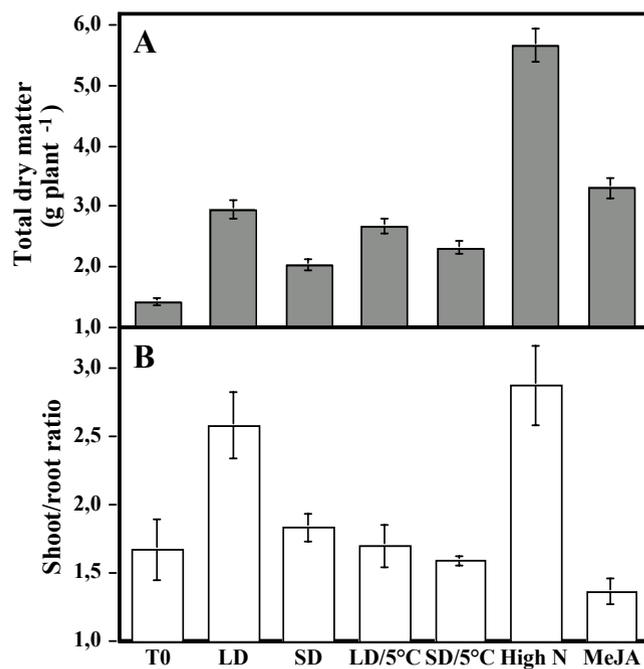
### **II-G- Calculation of N partitioning in plant**

N content and <sup>15</sup>N abundance in all organs were measured in continuous flow using a C/N analyzer linked to an isotope ratio mass spectrometer (Roboprep CN and mass spectrometer, Europa Scientific Ltd., Crewe, UK). Natural <sup>15</sup>N abundance (0.3663 % ± 0.0004) of atmospheric N<sub>2</sub> was used as reference for <sup>15</sup>N analysis. Therefore, atom % <sup>15</sup>N excess [E (%)] in a given organ was obtained by:

$$E (\%) = A (\%) - 0.3663$$

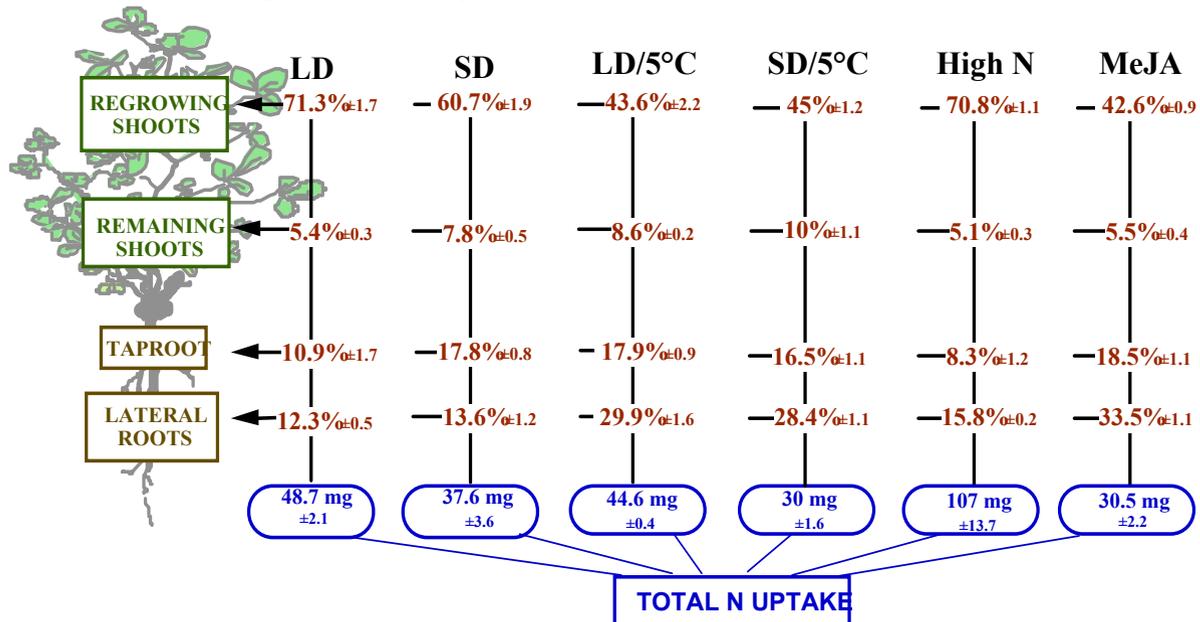
where A (%) is organ <sup>15</sup>N abundance given by spectrometry.

Nitrogen coming from uptake in a given organ (N<sub>Up</sub>) was calculated by:



**Figure III-1** : Effects of photoperiod, temperature, N availability and methyl-jasmonate (MeJA) on total dry matter (A) and shoot/root ratio (B). **T0** : first day of experiment (plants sampled 2 weeks after defoliation); T0+35 d with long-day (LD) photoperiod (16h day/8h night) at 20°C day-18°C night (LD) or 5°C day-5°C night (LD/5°C); T0+35 d with short-day (SD) photoperiod (8h day/16h night) at 20°C day/18°C night (SD) or 5°C day/5°C night (SD/5°C); T0+35 d with high nitrogen supply (High N, 5 mM KNO<sub>3</sub>); T0+35 d with methyl-jasmonate (MeJA, 100 μM). Vertical bars indicate the mean ± S.E. of n=3.

**Figure III-1** : Effets de l'héméropériode, de la température, de la disponibilité en azote et du méthyl-jasmonate sur la production de matière sèche (A) et sur le rapport biomasse aérienne/biomasse racinaire (B). **T0** : premier jour de l'expérimentation (plantes récoltées après 2 semaines de repousse); T0+35 j en héméropériode longue (LD) (16h jour/8h nuit) à 20°C jour-18°C nuit (LD) ou 5°C jour -5°C nuit (LD/5°C); T0+35 j en héméropériode courte (SD) (8h jour /16h nuit) à 20°C jour /18°C nuit (SD) ou 5°C jour /5°C nuit (SD/5°C); T0+35 j en présence d'une forte nutrition azotée (High N, 5 mM KNO<sub>3</sub>); T0+35 j en présence de méthyl-jasmonate (MeJA, 100 μM). Chaque barre verticale indique l'écart-type de la moyenne pour n=3.



**Figure III-2** : Influence of photoperiod, temperature, N availability and methyl-jasmonate on partitioning of N derived from uptake ( $N_{Up}$ ) in different organs of alfalfa after 35 d of treatment. Total N uptake during 35 d of treatment in plant is expressed in mg.plant<sup>-1</sup> and its partitioning is given as % of total N uptake for each organ. Values indicate the mean ± S.E. of n=3. Details of different treatments are given in Figure III-1.

**Figure III-2** : Influence de l'héméropériode, de la température, de la disponibilité en azote et du méthyl-jasmonate sur la répartition de l'azote absorbé ( $N_{Up}$ ) entre les différents organes de luzerne après 35 j de traitement. Les chiffres indiquent la quantité totale d'azote absorbé pendant 35 j dans la plante en mg.plant<sup>-1</sup> (en bleu) et sa répartition relative est donnée en % de l'azote total absorbé pour chaque organe (en rouge). Les valeurs indiquent l'écart-type de la moyenne pour n=3. Les détails des différents traitements sont donnés dans la Figure III-1.

$$N_{Up} = N_T \times [E(\%) / E_S(\%)]$$

where  $N_T$  is total nitrogen in organ ( $\text{mg}\cdot\text{plant}^{-1}$ )

and  $E_S$  is nutrient solution atom %  $^{15}\text{N}$  excess (2.5 %).

## **II-H- Statistical analysis**

Experiments were performed with 3 or 4 replicates (each replicate containing 4 plants). Results represented the mean  $\pm$  S.E. for  $n=3$  or 4. For RNA analysis (northern blot), results were given from the combined extracts of 3 replicates of taproots. The effects of photoperiod, low temperature, high N or MeJA application were studied by comparison of the mean using a student's *t*-test (Statview Student software, Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA).

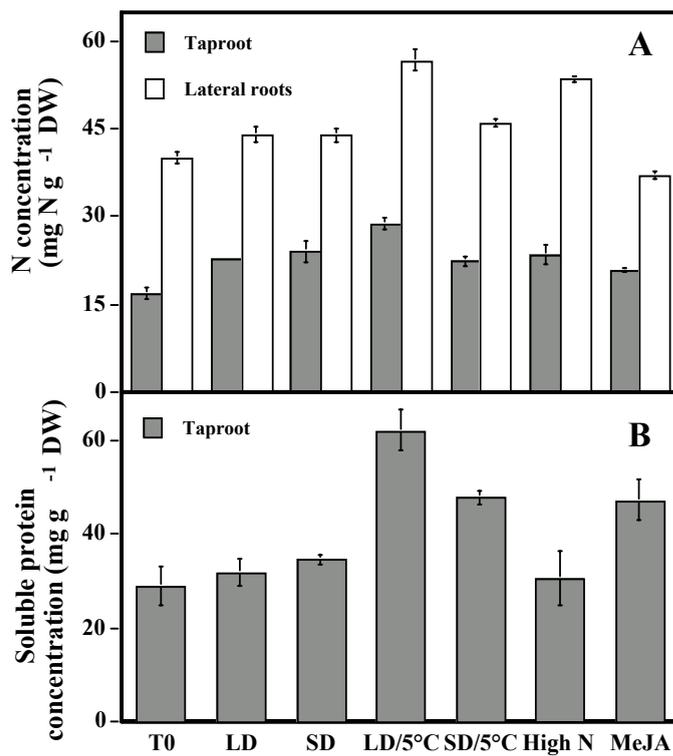
## **III- RESULTS**

### **III-A- Effects on growth and N partitioning in plant**

When compared to plants exposed to long-day conditions (LD) at 20°C, short-days conditions (SD) reduced ( $p < 0.05$ ) growth (2 vs 3 g DW  $\text{plant}^{-1}$ , Figure III-1A) and shoot/root ratio (1.8 vs 2.6, Figure III-1B). Limitation in photoperiod duration strongly reduced the regrowth of shoots. At 5°C, SD-treated plants produced less biomass than LD plants (2.3 vs 2.7 g DW  $\text{plant}^{-1}$ ) but their shoot/root ratios were similar (Figure III-1A and III-1B). Total growth was unaffected by low temperature but shoot/root ratio was significantly reduced when plants were exposed to low temperature in SD conditions (1.8 at 20°C and 1.6 at 5°C, Figure III-1B), and especially in LD conditions (2.6 at 20°C and 1.7 at 5°C).

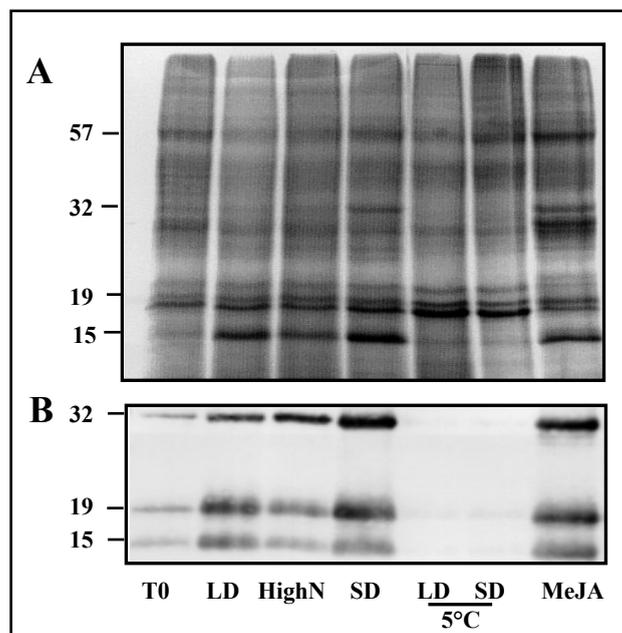
Increased N availability in nutrient solution (5 mM  $\text{KNO}_3$ ) enhanced growth ; total dry matter was twice that of control plants (LD) provided with 1 mM  $\text{KNO}_3$  (Figure III-1A). No significant difference ( $p > 0.05$ ) was observed in shoot/root ratio between High N and LD treatments (Figure III-1B). Total growth of plants treated with methyl jasmonate (MeJA) was not significantly affected in comparison with LD control plants (Figure III-1A), even though shoot/root ratio strongly decreased (from 2.6 to 1.4, Figure III-1B).

At both temperatures N uptake was reduced for plants in SD conditions in comparison with LD conditions (Figure III-2). At 20°C total N uptake after 35 d decreased significantly ( $p < 0.05$ ) from approximately 49 to 38 mg N  $\cdot\text{plant}^{-1}$  when photoperiod was shortened (Figure III-2). Furthermore, a photoperiod reduction at 20°C increased partitioning of N towards taproots (18 vs 11 %, Figure III-2), while N concentration in this organ remained unchanged (Figure III-3). In comparison, partitioning of N towards aerial tissues, in particular to regrowing shoots, was reduced from 71 % of total N in the LD treatment to 61 % when photoperiod was



**Figure III-3** : Effects of photoperiod, temperature, N availability and methyl-jasmonate on N concentration in lateral roots and taproots (A) and taproot soluble protein concentration (B) after 35 d of treatment. Vertical bars indicate the mean  $\pm$  S.E. of n=3. Details of different treatments are given in Figure III-1.

**Figure III-3** : Effets de l'héméroperiode, de la température, de la disponibilité en azote et du méthyl-jasmonate sur les teneurs en N des racines latérales et du pivot (A) et sur les teneurs en protéines solubles du pivot (B) après 35 j de traitement. Chaque barre verticale indique l'écart-type de la moyenne pour n=3. Les détails des différents traitements sont donnés dans la Figure III-1.



**Figure III-4** : Influence of photoperiod, temperature, N availability and methyl-jasmonate on VSP content. **A**- SDS-PAGE of taproot soluble proteins after staining with Coomassie brilliant blue. **B**- Immunodetection of VSPs by western blot after separation by SDS-PAGE. Values given in the left of SDS-PAGE and western blot indicate the molecular mass of VSPs (15, 19 and 32 kDa) and  $\beta$ -amylase (57 kDa). Details of different treatments are given in Figure III-1.

**Figure III-4** : Influence de l'héméroperiode, de la température, de la disponibilité en azote et du méthyl-jasmonate sur l'accumulation des VSP. **A**- Analyse SDS-PAGE des protéines solubles du pivot après coloration au bleu de Coomassie. **B**- Immunodetection des VSP par western blot après séparation en SDS-PAGE. Les masses moléculaires des VSP de 15, 19 et 32 kDa et de la  $\beta$ -amylase (57 kDa) sont indiquées sur la gauche du SDS-PAGE et du western blot. Les détails des différents traitements sont donnés dans la Figure III-1.

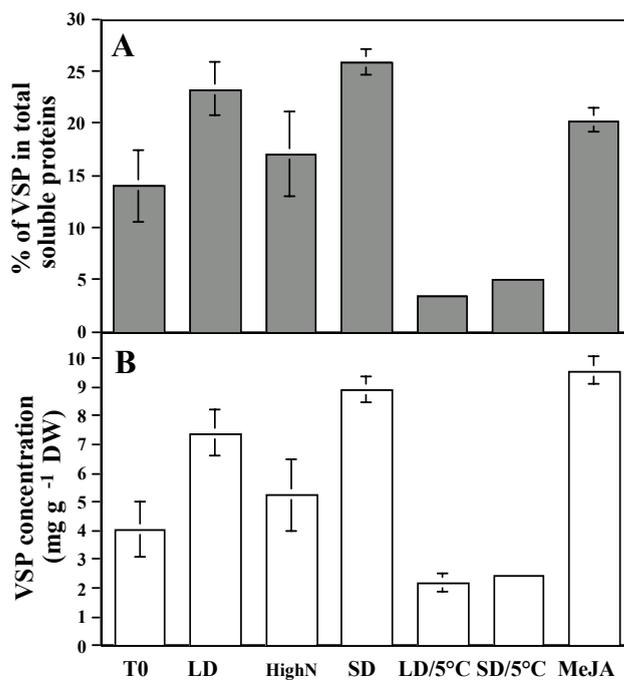
shortened (Figure III-2). N uptake was also reduced when temperature was reduced in LD (48 vs 44 mg.plant<sup>-1</sup> at 20°C and 5°C respectively, Figure III-2). Whatever the photoperiod treatment, plants exposed to low temperature (5°C) showed a preferential partitioning of N to roots. This increase was mostly noticeable for alfalfa under LD/5°C, where 30 % of N derived from uptake were partitioned to lateral roots vs 12 % at LD/20°C (Figure III-2). This preferential N allocation to roots was concomitant with a significant increase of N concentration ( $p<0.05$ ) in lateral roots (57 mg N.g<sup>-1</sup> DW for LD/5°C vs 44 mg N.g<sup>-1</sup> DW for LD/20°C, Figure III-3A). As a consequence, N partitioning to shoot tissues declined to approximately 45% when plants were exposed to 5°C in comparison to 20°C (Figure III-2).

When N availability in the nutrient solution increased, N uptake was more than two-fold higher than for control plants (Figure III-2). Total N uptake reached 107 mg.plant<sup>-1</sup> for the 5 mM KNO<sub>3</sub> treatment (High N) vs 48 mg.plant<sup>-1</sup> for 1 mM KNO<sub>3</sub> (LD). Relative N partitioning to various tissues was similar between LD and High N treatments (Figure III-2). With the MeJA treatment, N uptake decreased markedly ( $p<0.05$ ) reaching only 30 mg N.plant<sup>-1</sup> vs 49 mg N.plant<sup>-1</sup> for LD plants. Moreover, N partitioning was strongly modified, decreasing in regrowing shoots from 71 % (LD) to 42 % (MeJA), while increasing in the taproot and lateral roots (Figure III-2).

### **III-B- Effects on soluble protein content and VSP accumulation in the taproot**

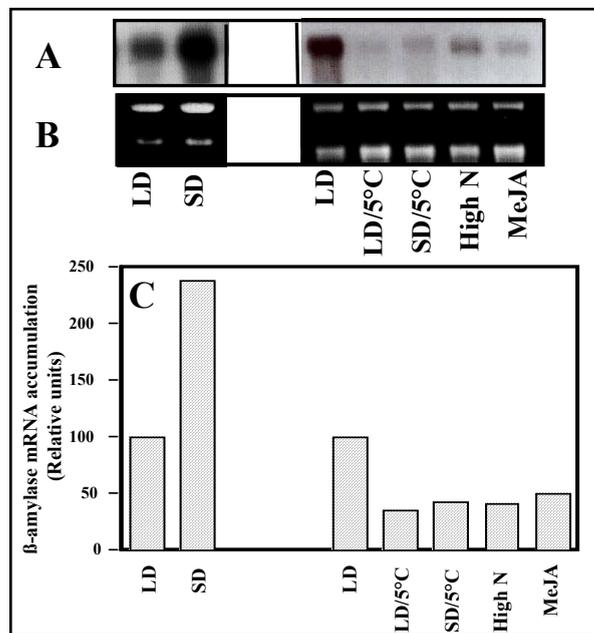
At 20°C, the soluble protein concentrations in taproots were not affected by the photoperiod treatment or N availability (Figure III-3B). However, for a given photoperiod treatment, taproot protein concentration at low temperature was significantly higher than in taproots of plants grown at 20°C. For example, soluble protein concentration reached 68 mg.g<sup>-1</sup> DW for LD/5°C vs 33 mg.g<sup>-1</sup> DW for LD/20°C conditions (Figure III-3B). In addition, MeJA application increased the taproot soluble protein concentration (47 mg.g<sup>-1</sup> DW) when compared to LD plants. Figures III-4 and III-5 showed that when plants were grown at 20°C, SD treatment led to a small but significant ( $p<0.07$ ) accumulation of VSP (9 mg.g<sup>-1</sup> DW for SD vs 7.4 mg.g<sup>-1</sup> DW for LD, Figure III-5B). VSPs represented 26% and 23% of total soluble proteins (Figure III-5A) for SD/20°C and LD/20°C, respectively. These results were consistent with the preferential partitioning of N to taproots previously described (Figure III-2).

Irrespective of photoperiod, VSP concentration decreased when temperature was reduced to 5°C (Figure III-5B) and represented less than 5% of total soluble proteins (Figure III-5A). When compared to plants growing at 20°C, immunoblotting clearly showed that VSPs were below the detection limit in taproots of alfalfa plants grown at 5°C (Figure III-4B). This reduction in VSP occurred even though N partitioning and relative concentration of soluble



**Figure III-5** : Influence of photoperiod, temperature, N availability and methyl-jasmonate on relative (A) or absolute (B) VSP concentration determined by ELISA quantification. Data are expressed as percentage of total soluble protein concentrations in taproot (A) or as mg of VSP per g of taproot dry weight (B). Vertical bars indicate the mean  $\pm$  S.E. of n=3. Details of different treatments are given in Figure III-1.

**Figure III-5** : Influence de l'héméroperiode, de la température, de la disponibilité en azote et du méthyl-jasmonate sur les teneurs relatives (A) ou absolues (B) en VSP déterminées par dosage ELISA. Les résultats sont exprimés en pourcentage des teneurs en protéines solubles totales du pivot (A) ou en mg de VSP par gramme de poids sec du pivot (B). Chaque barre verticale indique l'écart-type de la moyenne pour n=3. Les détails des différents traitements sont donnés dans la Figure III-1.



**Figure III-6** : Effects of photoperiod, temperature, N availability and methyl-jasmonate supply on expression of  $\beta$ -amylase transcripts. A- Hybridization of <sup>32</sup>P-labeled pMSBA1  $\beta$ -amylase insert to total taproot RNA (5  $\mu$ g). B- UV detected total taproot RNA after separation on agarose formaldehyde gel. C- Relative quantification of level of  $\beta$ -amylase transcript (results are given as percentage of transcript level of  $\beta$ -amylase observed in LD plants). Each analysis was performed with total RNA extracted from combined taproot samples of three different plants. Details of different treatments are given in Figure III-1.

**Figure III-6** : Effets de l'héméroperiode, de la température, de la disponibilité en azote et du méthyl-jasmonate sur l'expression des transcrits de la  $\beta$ -amylase. A- Hybridation par la sonde  $\beta$ -amylase pMSBA1 marquée au <sup>32</sup>P des ARN totaux de pivot (5  $\mu$ g). B- ARN totaux de pivot observés sous UV après séparation sur gel agarose. C- Quantification relative des niveaux de transcrits de  $\beta$ -amylase (les résultats sont exprimés en pourcentage du niveau de transcrit observé pour les plantes placées en héméroperiode longue). Chaque analyse est réalisée avec les ARN totaux extraits à partir d'échantillons combinés de pivots provenant de trois plantes différentes. Les détails des différents traitements sont donnés dans la Figure III-1.

protein increased significantly in taproots (Figure III-2 and III-3B). At 5°C, it must be pointed out that a very abundant 19 kDa polypeptide was detected in SDS-PAGE (Figure III-4A) while a very low level of 19 kDa-VSP was observed on immunoblot (Figure III-4B). In fact, as reported previously by Avice (1996), these two polypeptides are distinct because they possessed a different isoelectric point ( $pI = 7.2$  for the VSP of 19 kDa,  $pI = 5.6$  for the other 19 kDa polypeptide). With MeJA treatment (Figure III-4), the increase of N partitioning to roots and the accumulation of soluble proteins in taproots (Figure III-2 and Figure III-3B) were accompanied by a significant ( $p < 0.05$ ) accumulation of VSP ( $9.6 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$  for MeJA treatment vs  $7.4 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$  for LD plants, Figure III-5B). When compared to the LD treatment, the High N treatment did not significantly affect VSP accumulation (Figure III-4), nor did it alter N partitioning to taproots (Figure III-2) or taproot soluble protein content (Figure III-3B).

### **III-C- Effects on $\beta$ -amylase transcript level**

Recently, Gana *et al.* (1998) have suggested that  $\beta$ -amylase is a VSP based on its specific pattern of gene expression and its accumulation-utilization patterns during spring shoot growth and shoot regrowth in summer defoliation. In the present study we examined the effect of different treatments on  $\beta$ -amylase abundance (Figure III-4A) and its corresponding mRNA accumulation (Figure III-6).

Transcripts for  $\beta$ -amylase were 2.4 fold more abundant in SD conditions when compared to LD plants (Figure III-6). This result was correlated with SDS-PAGE profile (Figure III-4A), where  $\beta$ -amylase (57 kDa) is undetected by Coomassie brilliant blue staining in LD plants while this protein is more abundant the SD treatment. Although the abundance of  $\beta$ -amylase protein seems to be relatively high when plants were grown at low temperature (Figure III-4A), the steady-state transcript level for  $\beta$ -amylase was low at 5°C irrespective of photoperiod (Figure III-6A and III-6C). Confirmation of  $\beta$ -amylase abundance, and its relationship to  $\beta$ -amylase transcript level awaits results from the immunoblotting experiments. Reductions in  $\beta$ -amylase transcript levels were also observed with MeJA treatment. The increase of N availability (5 mM  $\text{KNO}_3$ ) in nutrient solution reduced the level of  $\beta$ -amylase transcript significantly when compared to LD plants (1 mM  $\text{KNO}_3$ ).

## **IV- DISCUSSION**

Our results showed that SD or low temperature induced large changes in source-sink relationships for N leading to a preferential allocation of N to roots of alfalfa (Figure III-2). The form of N accumulation resulting from this specific root allocation differed between treatments. Low temperature increased the total soluble protein pool in taproots without concomitant

accumulation of VSPs. On the other hand, short photoperiod specifically increased VSP content,  $\beta$ -amylase accumulation and transcript abundance in taproots, while the concentration of taproot soluble protein remained low. The effect of short photoperiod on VSP storage in the taproot of alfalfa is consistent with previous results obtained in white clover (*Trifolium repens* L., Bouchart *et al.*, 1998) or poplar (Coleman *et al.*, 1991), while low temperature effects seem to be in contradiction with other observations. For example, in white clover, exposure to 6°C had a synergistic effect with SD on accumulation of a VSP (17.3 kDa) stored in stolon (Bouchart *et al.*, 1998). Amongst woody species, particularly poplar, it is well-established that shortening daylength results in rapid accumulation of bark storage protein (32 kDa) and corresponding increase in transcript level for this VSP (Coleman *et al.*, 1991 ; Van Cleve and Apel, 1993). Application of low temperature within poplar enhanced VSP transcript abundance in bark tissues after 3 weeks of treatment (Van Cleve and Apel, 1993). In our experiments, VSP did not accumulate under low temperatures even in association with SD exposure (SD/5°C, Figure III-4 and III-5). Although it appears that the effect of late autumn environment on VSP accumulation initially observed by Hendershot and Volenec (1993a) was not easy to reproduce under controlled conditions, our results are consistent with some data obtained in field conditions (Li *et al.*, 1996 ; Cunningham and Volenec, 1998). By studying the seasonal changes of taproot N accumulation in different alfalfa cultivars, Cunningham and Volenec (1998) reported that concentration of VSPs (including  $\beta$ -amylase) increased 4-fold in autumn when photoperiod was decreasing and soil temperatures progressively declined, but always exceeded 4°C. Thereafter, VSP concentration declined gradually between November 12 and March 3 when daily soil temperature was frequently under 4°C and little or no shoot growth occurred. This suggests that temperature can modulate VSP accumulation. In future investigations, effort should be made to mimic the natural variations of light and temperature observed in field conditions during late autumn and early winter.

Increasing the N concentration in nutrient solution from 1 to 5 mM KNO<sub>3</sub> increased shoot growth, but did not change N partitioning in the different organs and VSP concentrations of alfalfa taproot. This contradicts results obtained in soybean (Staswick *et al.*, 1991) or poplar (Van Cleve and Apel, 1993) where VSP accumulation and transcript levels significantly increased with increased N availability. These different responses to high N fertilization could be explained by the specific tissue localization of VSPs which are stored in leaf (representing a strong sink organ for N) for soybean or in taproot (representing a low sink organ for N) for alfalfa. However, Staswick (1994) suggested that level of available N may have an indirect effect on VSP gene induction of soybean leaves. On the other hand, Ameziane *et al.* (1997) reported that VSP accumulation in *Cichorium intybus* L. was unaffected by increased N supply. In alfalfa, Kalengamaliro *et al.* (1997) have shown that addition of N fertilization (10 mM

$\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) increased total plant growth but did not influence root protein concentrations or the onset of VSP accumulation in young alfalfa seedlings. We have recently found that when 5-month-old alfalfa plants received high N concentration in the nutrient solution (20 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) VSPs were not accumulated to a higher extent after 21 days of treatment in comparison with plants provided with 1 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (data not shown). This suggests that induction of VSP expression in alfalfa taproot is not regulated directly by availability of inorganic N.

The MeJA treatment reduced shoot growth and modified N partitioning in favor of roots, specifically the taproot. The increased allocation of N to taproots led to the accumulation of soluble proteins. In comparison with the LD treatment, and contrary to low temperature effect, the increase in taproot protein was concomitant with a highly significant accumulation of VSP. Although the positive effect of MeJA on alfalfa VSP accumulation expression was observed after 35 days of treatment, these results can be compared to similar observations obtained in soybean or *Arabidopsis thaliana*. JA and MeJA rapidly induced VSP mRNA levels in soybean leaves (Mason and Mullet, 1990 ; Staswick, 1990 ; Anderson, 1991) or in leaves and roots of *Arabidopsis thaliana* (Berger *et al.*, 1995). Additional results have shown that the effect of JA in soybean was enhanced by the increase of soluble sugar contents (Mason *et al.*, 1992) but could be down-regulated in the presence of high concentrations of inorganic phosphate (Sadka *et al.*, 1994) or auxin (Dewald *et al.*, 1994). These data suggest that endogenous factors such as trophic molecules or plant growth regulators are probably involved in regulation of VSP gene expression.

This study showed that signals involved in the regulation of N traffic in plants (uptake, partitioning, utilization for growth or storage as VSP) are very complex. Our results in alfalfa show that environmental factors such as reducing photoperiod significantly alters N partitioning within the plant, and finally VSP and  $\beta$ -amylase accumulation. Our study prompts questions about the identity and the transduction pathways of specific signals that may be involved in VSP up-regulation. In future investigations, the effect of MeJA needs to be verified by changing timing, concentration, and frequency of MeJA application. In addition, the putative roles of other plant growth regulators such as gibberellic acid or abscisic acid will be tested.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Suzanne Cunningham (Agronomy Department, Purdue University, IN, USA) for supplying the cDNA probe of alfalfa  $\beta$ -amylase. We also thank M.L. Portet and M. Hugon (spring students) for their invaluable help in sample acquisition and developing of ELISA.

***CHAPITRE IV : Influence de l'héméroperiode sur l'absorption d'azote, la répartition d'azote et l'accumulation de protéines de réserve des organes végétatifs chez deux variétés de Medicago sativa L. (article 2)***

---

---

## **CHAPITRE IV :**

### **INFLUENCE DE L'HEMEROPERIODE SUR L'ABSORPTION D'AZOTE, LA REPARTITION D'AZOTE ET L'ACCUMULATION DE PROTEINES DE RESERVE DES ORGANES VEGETATIFS CHEZ DEUX VARIETES DE *MEDICAGO SATIVA* (Article 2)**

---

**Short-day photoperiod induces changes in N uptake, N partitioning and accumulation of vegetative storage proteins in two *Medicago sativa* cultivars**

Running title: SD-induced accumulation of VSPs in alfalfa

Carine Noquet<sup>A</sup>, Frédéric Meuriot<sup>A</sup>, Sébastien Caillot<sup>A</sup>, Jean-Christophe Avice<sup>A</sup>,  
Alain Ourry<sup>A</sup>, Suzanne M. Cunningham<sup>B</sup> and Jeffrey J. Volenec<sup>B</sup>

***Functional Plant Biology*, 30, 853-863, 2003.**

A- UMR INRA-UCBN 950 EVA et nutritions NCS, Institut de Recherche en Biologie Appliquée, Université, 14032 Caen Cedex, France.

B-Department of Agronomy, Lilly Hall of Life Sciences, 915 W. State St., Purdue University, West Lafayette, IN 47907-2054, USA.

*Keywords:* *Medicago sativa* L., N partitioning, N reserves, phytochrome, regulation, short day, VSP accumulation.

## Abstract

Our objective was to study the effect of short-day photoperiod during 28, 42 and 56 d on growth, N uptake and N partitioning, particularly vegetative storage protein (VSP) accumulation in taproots of two alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars (Lodi and Europe). For both varieties, the reduction of daylength from 16h (long day, LD) to 8h (short day, SD) for 28 d reduced total plant growth by decreasing shoot growth. Nitrogen uptake and N distribution within the plant was determined by  $^{15}\text{N}$  labelling. N uptake decreased with SD treatment duration, and was 2 and 3-fold lower for Europe and Lodi, respectively, for 56 d in SD conditions when compared with LD plants. The SD treatment resulted in preferential partitioning of N to taproots in comparison with LD conditions (19 vs 9 % for Lodi and 12 vs 5 % for Europe after 28 d). For both cultivars, the SD-induced changes in N allocation to taproots did not significantly affect taproot soluble protein concentrations during 42 d of daylength treatment. In contrast, VSP accumulation occurred after only 28 d for plants grown in SD conditions (6.2 vs 4.8 mg.g<sup>-1</sup> DW for Lodi and 5.1 vs 1.4 mg.g<sup>-1</sup> DW for Europe). SD exposure also increased *vsp 57* and *vsp 32* mRNA transcript levels in Lodi and Europe (up to 2 fold higher) taproots in SD for 28 d compared to LD conditions. Overall results indicate that photoperiod modulates taproot N accumulation in alfalfa by enhancing both  $\beta$ -amylase (*vsp 57*) and *vsp 32* gene expression and accumulation. The enhanced VSP accumulation by short-day photoperiod may result from altered VSP gene expression / transcript stability or occur indirectly through altered N source-sink relationships. Additionally, when SD treatment included a night break with 15 min illumination with sodium high pressure light or red light, our results suggest that the induction of *vsp 57* and *vsp 32* gene expressions by SD signal is mediated by the phytochrome system.

## Résumé

Notre objectif était d'étudier l'effet de l'héméropériode courte après 28, 42 et 56 jours sur la croissance, l'absorption d'azote et l'allocation d'azote, et plus particulièrement l'accumulation de VSP dans le pivot chez deux cultivars de luzerne (Lodi et Europe). Chez les deux variétés, la réduction de la longueur du jour de 16h (jours longs, LD) à 8h (jours courts, SD) réduit la croissance totale en diminuant la croissance aérienne au bout de 28 jours. L'absorption et la distribution de l'azote au sein de la plante ont été déterminées par un marquage isotopique  $^{15}\text{N}$ . L'absorption d'azote diminue alors que la durée de traitement en jours courts se prolonge : elle est 2 et 3 fois plus faible respectivement pour Europe et Lodi après 56 jours en conditions de jours longs en comparaison avec des plantes placées en jours longs. Le traitement jours courts conduit à une répartition préférentielle de l'azote vers le pivot comparativement aux conditions de jours longs (19 vs 9 % pour Lodi et 12 vs 5 % pour Europe après 28 jours). Pour les deux cultivars, les changements de répartition d'azote en faveur du pivot induits par les jours courts ne modifient pas significativement les teneurs en protéines solubles du pivot après 42 jours de

traitement. Cependant, l'accumulation des VSP intervient après seulement 28 jours pour les plantes cultivées en conditions de jours courts par rapport aux jours longs (6.2 vs 4.8 mg.g<sup>-1</sup> MS chez Lodi et 5.1 vs 1.4 mg.g<sup>-1</sup> MS chez Europe). L'exposition en jours courts augmente également les niveaux de transcrits ARNm de *vsp 57* et *vsp 32* du pivot chez Lodi et Europe (d'un facteur pouvant aller jusqu'à 2) au bout de 28 jours de traitement jours courts en comparaison aux conditions de jours longs. L'ensemble de nos résultats indique que l'héméroperiode module l'accumulation d'azote dans le pivot de luzerne en augmentant l'expression et l'accumulation de la  $\beta$ -amylase (*vsp 57*) et de la *vsp 32*. L'augmentation de l'accumulation des VSP sous l'effet de l'héméroperiode courte pourrait résulter d'une modification de la stabilité de l'expression des gènes ou des transcrits des VSP ou intervenir indirectement *via* la modification des relations source-puits pour l'azote. De plus, nos résultats suggèrent que lorsque la période nocturne du traitement jours courts est interrompue par l'application de flashes de 15 minutes de lumière blanche ou rouge (lampe sodium haute pression), l'induction de l'expression des gènes de *vsp 57* et *vsp 32* par le signal "jour court" est relayée par le système phytochrome.

## **I- INTRODUCTION**

In forage species such as alfalfa (*Medicago sativa* L.), nitrogen stored in perenniating organs like crowns and taproots plays a significant role in supplying N to shoots during initial spring growth and during shoot re-growth after defoliation (Volenc *et al.*, 1996). Among the different N pools potentially involved in this process, amino acids and soluble proteins are quantitatively the most important N fractions in alfalfa taproots. Soluble proteins accumulated in taproots are extensively mobilized to sustain shoot re-growth in early spring and after defoliation (Hendershot and Volenc, 1993a, b ; Avicé *et al.*, 1996a). Qualitative analysis of soluble proteins by SDS-PAGE have showed that three polypeptides of 32, 19 and 15 kDa, representing up to 40% of water-soluble proteins of taproots, exhibit a pattern of preferential mobilization / accumulation when shoot growth resumed in spring (Hendershot and Volenc, 1993a) or after cutting (Hendershot and Volenc, 1993b ; Avicé *et al.*, 1996a). Polyclonal antibodies raised against these VSPs (Cunningham and Volenc, 1996) were used to immunolocalize them, primarily in vacuoles of parenchyma cells of wood rays and bark of alfalfa taproots (Avicé *et al.*, 1996a). These observations confirm that these three polypeptides possess features of vegetative storage protein (VSP), as defined previously by Cyr and Bewley (1990b) and Staswick (1994). Recently, Gana *et al.* (1998) demonstrated that  $\beta$ -amylase (57 kDa) accumulates to high concentrations in alfalfa taproots (up to 8% of total soluble protein) and is degraded to amino acids that serve as an N source for regrowing shoots. These authors suggested that  $\beta$ -amylase also acts as a VSP in taproots of this species.

Numerous studies of the seasonal changes of taproot N storage in several alfalfa cultivars, (Hendershot and Volenc, 1993a ; Cunningham and Volenc, 1998 ; Justes *et al.*, 2002 ; Dhont *et al.*, 2003) have reported that VSP concentrations increased markedly in autumn, when daylength and soil temperatures progressively declined. These results suggested that environmental factors such as photoperiod and / or temperature are involved in controlling VSP deposition in autumn and early winter. The role of these environmental signals has been recently investigated in alfalfa grown under controlled conditions by Noquet *et al.* (2001). These authors showed that SD or low temperature induced large changes in source-sink relationships for N, leading to preferential allocation of N to taproots after 35 d of treatment. Nevertheless, low temperature increased the total soluble protein pool in taproots without concomitant accumulation of VSPs, while SD specifically increased VSP content and  $\beta$ -amylase transcript level in taproots.

Photoperiod affects various physiological processes that alter plant growth and development such as seed germination, flowering, stem growth, flowering, cold acclimation and dormancy (Salisbury, 1981 ; Thomas and Vince-Prue, 1997), but little is known about the effects of daylength on N re-mobilization and storage (Zhu and Coleman, 2001a, b). In woody species,

particularly poplar, it is well established that shortening daylength results in rapid accumulation of bark storage protein (BSP, 32 kDa), with a corresponding increase in BSP transcript level (Coleman *et al.*, 1992 ; Langheinrich and Tischner, 1991 ; Van Cleve and Apel, 1993). Recently, Zhu and Coleman (2001a) showed that the BSP promoter of poplar was responsive to photoperiod. Additionally, the transcriptional activation of this promoter significantly increased with SD treatment, but was strongly inhibited by SD that included an interruption of dark period with 15 min illumination with incandescent light (Zhu and Coleman, 2001b) suggesting that SD signal was phytochrome-mediated. Moreover, in herbaceous plants, synthesis of patatin, a VSP that accumulates in tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.) was also induced by SD conditions (Paiva *et al.*, 1983).

The mechanisms controlling accumulation of VSPs in alfalfa taproots during autumn and early winter are poorly understood. Our objective was to study the effect of short photoperiod on growth, N uptake and N partitioning, particularly VSP accumulation in taproots of two contrasted alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars (Lodi and Europe). The cultivar Europe is largely cultivated in the north of France whereas Lodi is better adapted to the south of France and Italy. Lodi is more tolerant to frequent defoliation and possesses more rapid re-accumulation of VSP during regrowth after defoliation than Europe (Avice *et al.*, 1997b). Our results support the involvement of photoperiod in quantitative and qualitative aspects of taproot N storage. We also show that (i) the accumulation of alfalfa taproot VSPs is associated with SD and paralleled with increase in steady-state transcript levels for the 57 (β-amylase) and 32 kDa VSPs and (ii) the induction of VSP gene expression by SD is mediated by the phytochrome system.

## **II- MATERIALS AND METHODS**

### **II-A- Plant material and application of photoperiod treatments**

Seeds of two alfalfa genotypes (*Medicago sativa* L. cv. Europe and Lodi) were germinated on a synthetic substrate (Oasis growing pinpot, Agrimedia, TCA Engineering, Battenheim, France). After 15 d, when primary trifoliolate leaves appeared, seedlings were transferred to plastic pots filled with perlite and irrigated three times per week with 300 mL of a complete nutrient solution (0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.15 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 mM Fe-Na EDTA ; 14 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5 μM MnSO<sub>4</sub>, 3 μM ZnSO<sub>4</sub>, 0.7 μM CuSO<sub>4</sub>, 0.7 μM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> Mo<sub>7</sub>O<sub>2</sub>, and 0.1 μM CoCl<sub>2</sub> ; (Kim *et al.*, 1993a). Two millimolar NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> were also supplied in nutrient solution to repress nodule formation. Plants were grown under greenhouse conditions with a thermoperiod of 20°C (day) and 18°C (night) and a photoperiod of 16h (day) and 8h (night). After four months, plants were defoliated 6 cm above soil level and transferred to a continuously aerated hydroponic nutrient solution in 8 L plastic containers. The

composition of nutrient solution was identical to the above-described solution except that 1 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  was substituted for the 2 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Nutrient solutions were renewed every 5 d to prevent  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  deficiency and to minimize pH variation.

Previous results (Kim *et al.*, 1993a ; Avice *et al.*, 1996a) showed that depletion of N reserves occurred during the first two weeks following shoot removal and thereafter, soluble proteins slowly re-accumulated in taproots. In order to focus on the accumulation of N reserves, experiment I was started after 15 d of re-growth in hydroponic conditions (day 0) when plants were placed into one of the two following photoperiod treatments for 28 d (day 0 + 28 d), 42 d (day 0 + 42 d), or 56 d (day 0 + 56 d): long-day photoperiod (16h light/8h darkness) at 20°C day/18°C night (**LD**) or short-day photoperiod (8h light/16h darkness) at 20°C day/18°C night (**SD**). Throughout experiment I, the N source ( $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ , 1 mM) was labelled with 2.5 atom %  $^{15}\text{N}$  excess and light was supplemented with sodium high-pressure lamps (phytoclaude 400W) supplying approximately 400  $\mu\text{moles photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  15 cm above crown level.

In experiment II, 15 d after re-growth in hydroponic conditions (day 0), Europe plants were placed in a short-day photoperiod (8h light/16h darkness) at 20°C day/18°C night (**SD**) or were submitted nightly to 15 min night-break pulses in the middle of the dark period, either with sodium high pressure light only (night break = **NB**) or plus red light filter (**R**) (Flame Red red filter,  $600\text{nm} \leq \lambda \leq 800 \text{ nm}$ , Lee filters, Gestion Scenique, Poitiers, France) for 21 d (day 0 + 21 d), 35 d (day 0 + 35 d), or 49 d (day 0 + 49 d). The use of SD with night interruption ensures that differences between LD and SD were related to the experimental treatments and not light duration and/or photosynthetic differences, since a 16h LD exposes plants to twice as much light as a SD.

## **II-B- Tissue sampling**

Plants were sampled on day 0 of treatment (*i.e.* 15 d after defoliation = day 0) and 28, 42 or 56 d in experiment I, and 21, 35 or 49 d in experiment II after transfer to the photoperiod treatments. Plants were separated into lateral roots, taproots, remaining leaves and stems on the crown, and re-growing leaves and stems. Fresh weight of each sample was determined. Taproot samples were immediately frozen in liquid  $\text{N}_2$ . Root samples were freeze-dried, ground and stored at  $-30^\circ\text{C}$  for further N, protein and VSP quantifications. Shoot tissues were dried at  $70^\circ\text{C}$  for 72h, ground and stored under vacuum with desiccant until N analysis.

## **II-C- Protein extraction and analysis**

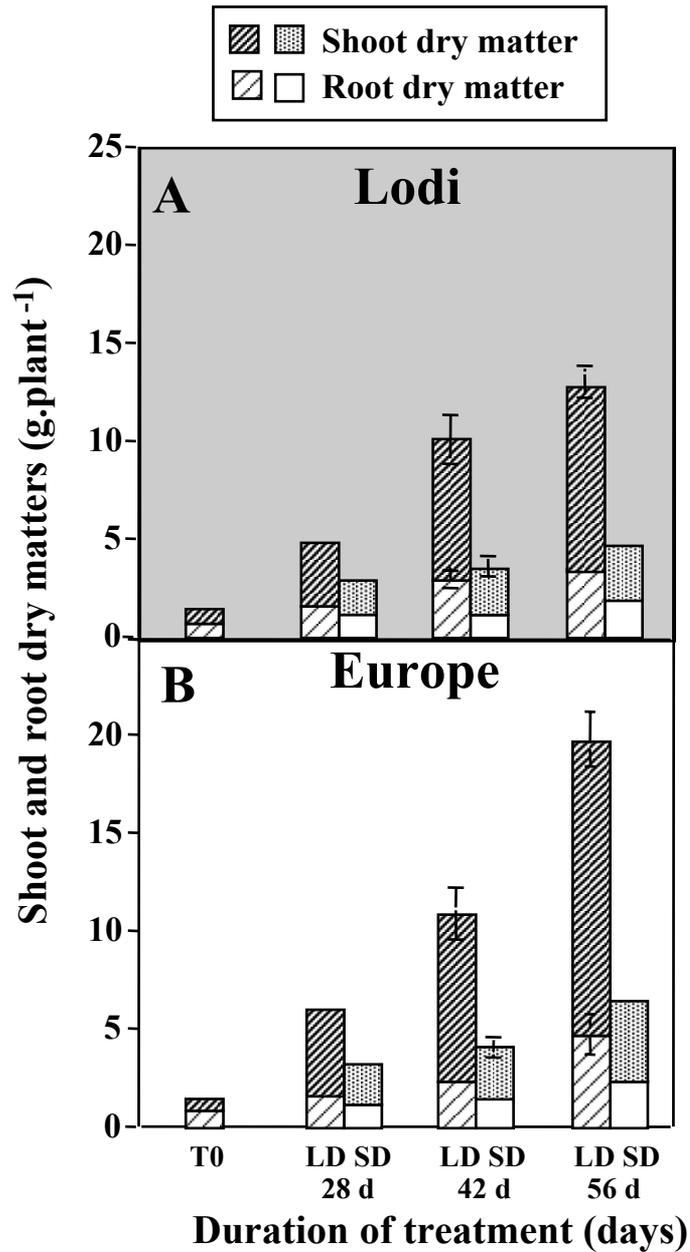
Protein analysis was previously described by Cunningham and Volenec (1998) and Noquet *et al.* (2001). Briefly, proteins were extracted at  $4^\circ\text{C}$  by suspending 300 mg of ground, freeze-dried taproot with 5 mL of extraction buffer (pH 7) containing 100 mM sodium phosphate and

10  $\mu$ M 2-mercaptoethanol. After centrifugation (3200 g, 4°C for 20 min), the pellet was re-extracted in 5 mL of extraction buffer and the resulting two supernatants were pooled and corresponded to the soluble protein extract. An aliquot of this extract was used for determination of soluble proteins concentration by the method of Bradford (1976) and for VSP quantification by ELISA, as described by Noquet *et al.* (2001).

#### **II-D- Analysis of *vsp* 57 kDa ( $\beta$ -amylase) and *vsp* 32 kDa transcripts levels**

Total RNA was extracted according to the procedure of Gana *et al.* (1998). Ground, freeze-dried taproot (300mg) in liquid N<sub>2</sub> was transferred to tubes containing 0.2 g of polyvinylpyrrolidone and 4 mL of water-saturated phenol (65°C) and placed at 65°C in a water bath. When samples thawed, 4 mL of RNA-extraction buffer (0.2 M sodium acetate, pH 5.2, 0.01 M EDTA, 1 % SDS) were added to each tube, followed by incubation at 65°C for 15 min with a 30 sec vortex every 2 min. After a 15 min incubation at 25°C, 4 mL of chloroform were added, and the tubes were shaken for 10 min at room temperature. The emulsion was centrifuged (18500 g, 20°C for 30 min) and the lower organic phase discarded. The upper phase and flocculent interphase were extracted with 4 mL phenol / chloroform / isoamylalcohol 24:24:1 (v/v/v) and centrifugation was repeated. The upper aqueous phase was transferred to a fresh centrifuge tube and chloroform:isoamylalcohol 24:1 (v/v) was added. Centrifugation and recovery of the RNA pellet were conducted as described by Ougham and Davies (1990).

Details of the northern hybridization methods were described previously by Noquet *et al.* (2001). Total RNA (5  $\mu$ g) was separated on 1.5% agarose formaldehyde gels (Sambrook *et al.*, 1989), transferred to nylon membranes (Gene Screen, NEN Life Science products, Boston, MA, USA) and linked covalently by UV transillumination for 30 sec (Biorad, Ivry sur Seine, France). The membranes were pre-hybridized (7% SDS, 0.25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA, 0.2 mg mL<sup>-1</sup> heparin, 0.1 mg mL<sup>-1</sup> DNA salmon sperm) for 2 h at 55°C with slow shaking and then hybridized with <sup>32</sup>P-labelled pMSBA1  $\beta$ -amylase insert (GenBank Accession AFO26217, Gana *et al.*, 1998). Isolation of the  $\beta$ -amylase insert was described by Noquet *et al.* (2001). The membranes were stripped by washing twice in 0.5 % SDS, 0.1 x SSC at 95 °C for 20 min and then re-probed with a <sup>32</sup>P-labelled 32 kDa VSP insert (Genbank Accession AF 530579). The 32 kDa VSP in the pBluescript SK(-) vector was isolated by digestion with Xho I and Pst I using an extraction kit (Quiagen, GmbH, Hilden, Germany). Finally, in order to correct RNA loading differences, the <sup>32</sup>P-labelled 32 kDa probe was stripped from the membrane before re-hybridization with a <sup>32</sup>P-labelled pea 18S ribosomal probe. Each insert was labelled with [<sup>32</sup>P]dCTP using random priming (Feinberg and Vogelstein, 1983) with NE blot (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). After each hybridization, membranes were exposed to a phosphor screen for 1h and signal intensities quantified using a phosphor imager (Packard Cyclone storage phosphor system,



**Figure IV-1** : Effects of photoperiod on total dry matter production in g.plant<sup>-1</sup> by two cultivars of *Medicago sativa* L. (A- Lodi, and B- Europe) after 28, 42 and 56 d of exposure to photoperiod treatments. **Day 0** : day 0 of experiment (15 d after defoliation) ; **LD** : long-day photoperiod (16h light-8h darkness) ; **SD** : short-day photoperiod (8h light-16h darkness). Vertical bars indicate the mean  $\pm$  S.E. for n=3.

**Figure IV-1** : Effets de l'héméroperiode sur la production totale de matière sèche en g.plant<sup>-1</sup> par deux variétés de *Medicago sativa* L. (A- Lodi, and B- Europe) après 28, 42 et 56 jours d'exposition aux variations d'héméroperiode. **Day 0** : jour 0 de l'expérimentation (15 jours après coupe) ; **LD** : jours longs (16h jour-8h nuit) ; **SD** : jours courts (8h jour-16h nuit). Chaque barre verticale indique l'écart-type de la moyenne pour n=3.

**Table IV-I** : Effects of photoperiod on total N (mg N plant<sup>-1</sup>) of two cultivars of *Medicago sativa* L. (Lodi and Europe) after 28, 42 and 56 d of exposure to photoperiod treatments. **Day 0** : day 0 of experiment (15 d after defoliation) ; **LD** : long-day photoperiod (16h light-8h darkness) ; **SD** : short-day photoperiod (8h light-16h darkness). Each value indicates the mean  $\pm$  S.E. for n=3.

**Tableau IV-I** : Effets de l'héméropériode sur la quantité d'azote total (mg N plant<sup>-1</sup>) de deux variétés de *Medicago sativa* L. (Lodi and Europe) après 28, 42 et 56 jours d'exposition aux variations d'héméropériode. **Day 0** : jour 0 de l'expérimentation (15 jours après coupe) ; **LD** : jours longs (16h jour-8h nuit); **SD** : jours courts (8h jour-16h nuit). Les valeurs indiquent la moyenne  $\pm$  S.E. pour n=3.

Treatment	Lodi		Europe	
	LD	SD	LD	SD
<b>0</b>	51.4 $\pm$ 5.3	51.4 $\pm$ 5.3	42 $\pm$ 4.7	42 $\pm$ 4.7
<b>28</b>	187 $\pm$ 46.2	111 $\pm$ 12.9	240 $\pm$ 58	119 $\pm$ 22
<b>42</b>	372 $\pm$ 55.2	147 $\pm$ 37.8	363 $\pm$ 17.6	151 $\pm$ 44.9
<b>56</b>	521 $\pm$ 64.2	231 $\pm$ 59.8	616 $\pm$ 21.2	318 $\pm$ 61

Packard Instrument Company, Niles, IL, USA). Following each quantification, membranes also were exposed to radiographic film at  $-80^{\circ}\text{C}$  and developed as described by the manufacturer (Eastman Kodak Company, New York, NY, USA). After each stripping, phosphor imaging was used to verify complete removal of the probe.

### **II-E- Calculation of N partitioning in plants**

$^{15}\text{N}$  labelling allow us to determine N taken up during the experiment, by distinguishing it from endogenous N previously present in the plant (unlabelled N). The measurement of the  $^{15}\text{N}$  abundance in the different organs could be used to determine the allocation of N derived from the mineral N taken up during the time of experiment, as we described in previous studies (Noquet *et al.*, 2001). N content and  $^{15}\text{N}$  abundance in all organs were measured in continuous flow using a C/N analyzer linked to an isotope ratio mass spectrometer (IRMS, Roboprep CN and mass spectrometer, PDZ Europa, Crewe, UK). Natural  $^{15}\text{N}$  abundance ( $0.3663\% \pm 0.0004$ ) of atmospheric  $\text{N}_2$  was used as reference for  $^{15}\text{N}$  analysis.

Therefore, atom %  $^{15}\text{N}$  excess E (%) in a given organ was obtained by:

$$E (\%) = A (\%) - 0.3663$$

where A (%) is organ  $^{15}\text{N}$  abundance given by spectrometry.

Nitrogen coming from uptake in a given organ ( $\text{N}_{\text{Up}}$ ) was calculated as follows:

$$\text{N}_{\text{Up}} = \text{N}_{\text{T}} \times (E (\%) / \text{E}_{\text{S}} (\%))$$

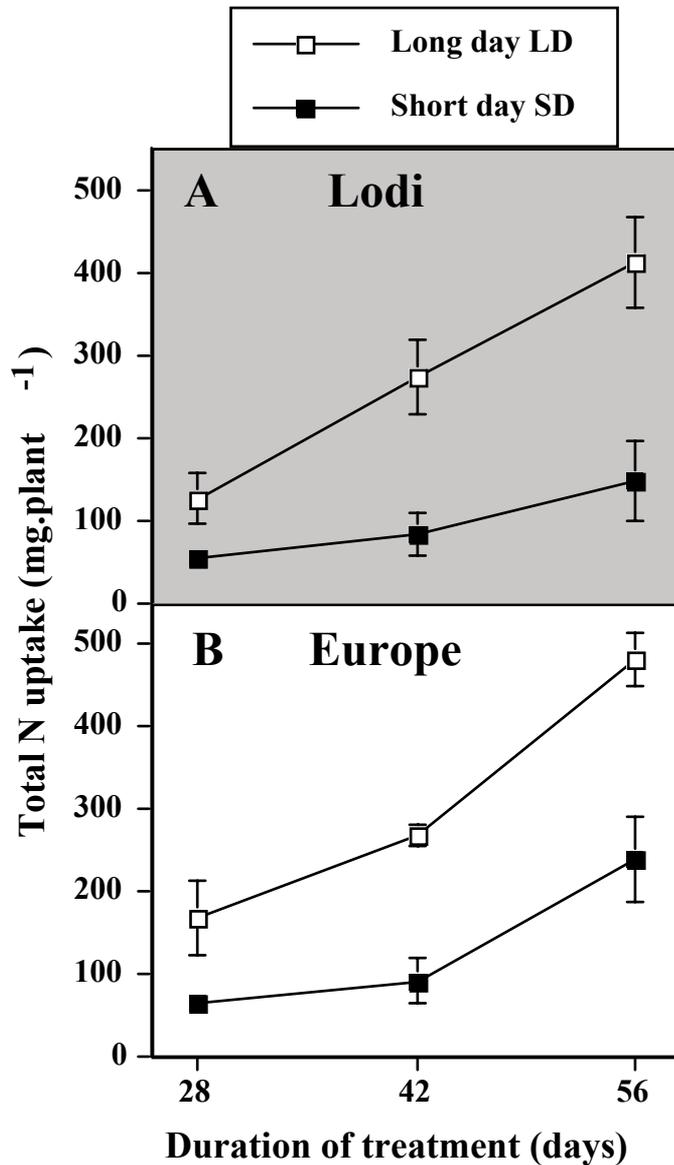
where  $\text{N}_{\text{T}}$  is total nitrogen in organ ( $\text{mg plant}^{-1}$ )

and  $\text{E}_{\text{S}}$  is nutrient solution atom %  $^{15}\text{N}$  excess (2.5 %)

Results are given as relative partitioning of N uptake (% of total N uptake) for each date of treatment (28, 42, and 56 d).

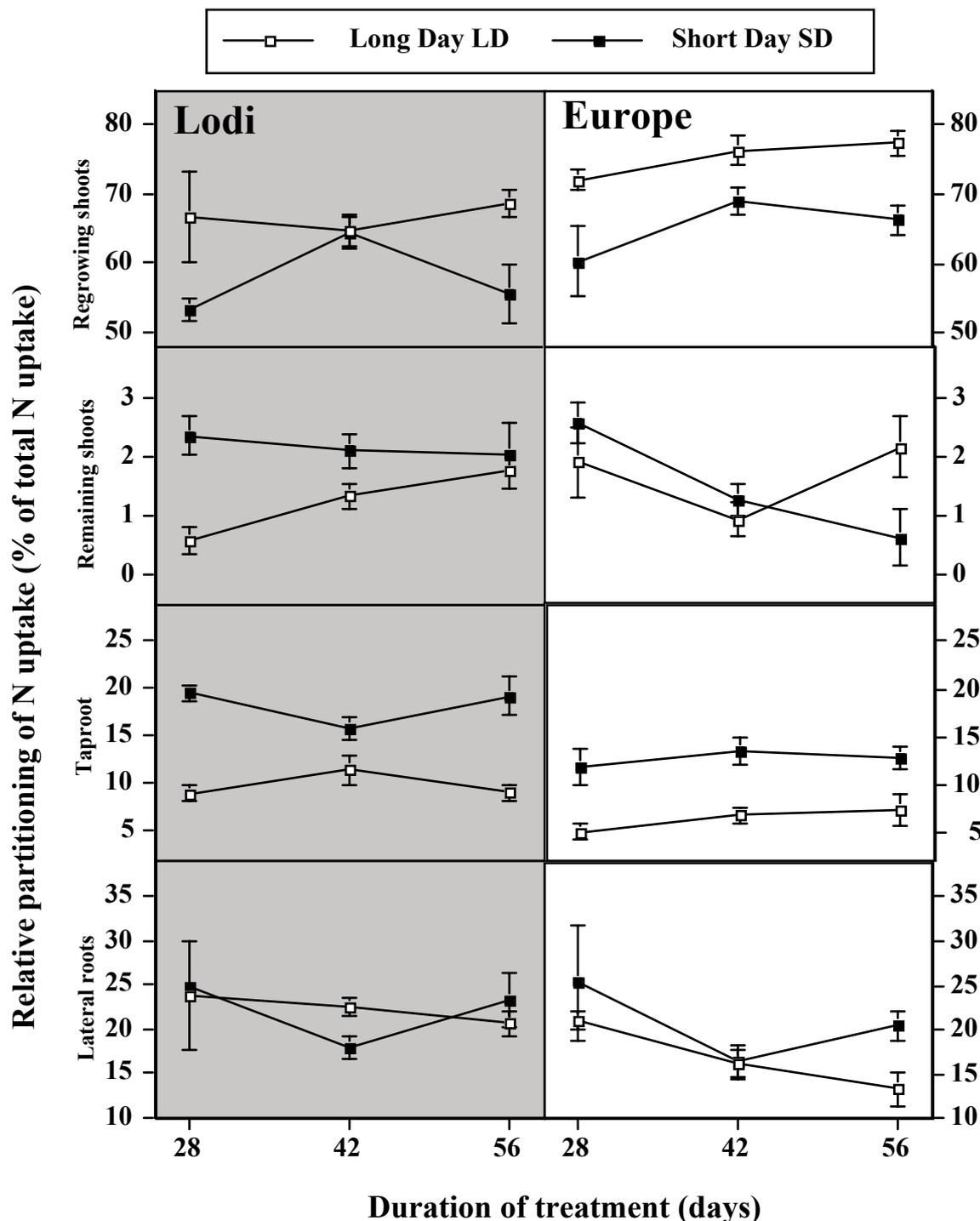
### **II-F- Statistical analysis**

The experiments were performed with 3 replicates (each replicate containing 4 plants). Results represented the mean  $\pm$  S.E. for  $n=3$ . For RNA analysis (northern blot), results were given from the combined extracts of 3 replicates of taproots. The effects of photoperiod treatments or cultivars were analyzed by Student's *t*-test (Statview Student software, Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA).



**Figure IV-2:** Effects of photoperiod on total N uptake ( $N_{Up}$ ) in  $\text{mg plant}^{-1}$  by two cultivars of *Medicago sativa* L. (A- Lodi and B- Europe) after 28, 42 and 56 d of exposure to photoperiod treatments. **LD** : long-day photoperiod (16h light-8h darkness) ; **SD** : short-day photoperiod (8h light-16h darkness). Values indicate the mean  $\pm$  S.E. for  $n=3$ .

**Figure IV-2:** Effets de l'héméropériode sur la quantité d'azote total absorbé ( $N_{Up}$ ) en  $\text{mg plant}^{-1}$  par deux variétés de *Medicago sativa* L. (A- Lodi and B- Europe) après 28, 42 et 56 jours d'exposition aux variations d'héméropériode. **LD** : jours longs (16h jour-8h nuit) ; **SD** : jours courts (8h jour-16h nuit). Les valeurs indiquent la moyenne  $\pm$  S.E. pour  $n=3$ .



**Figure IV-3** : Effects of photoperiod on partitioning of N derived from uptake ( $N_{Up}$ ) to re-growing shoots, shoots remaining on crowns at defoliation on day 0, taproots, and lateral roots of two cultivars of *Medicago sativa* L. (Lodi and Europe) after 28, 42 and 56 d of exposure to photoperiod treatments. N partitioning is expressed as the percentage of total plant N uptake for each organ. **LD** : long-day photoperiod (16h light-8 h darkness) ; **SD** : short-day photoperiod (8h light-16h darkness). Values indicate the mean  $\pm$  S.E. for n=3.

**Figure IV-3** : Effets de l'héméropériode sur la répartition de l'azote dérivant de l'absorption ( $N_{Up}$ ) vers les organes néo-formés, les organes laissés en place au jour 0 de la coupe, le pivot et les racines latérales chez deux variétés de *Medicago sativa* L. (Lodi and Europe) après 28, 42 et 56 jours d'exposition aux variations d'héméropériode. La répartition d'azote est exprimée en pourcentage de l'azote total absorbé pour chaque organe. **LD** : jours longs (16h jour-8h nuit) ; **SD** : jours courts (8h jour-16h nuit). Les valeurs indiquent la moyenne  $\pm$  S.E. pour n=3.

### **III- RESULTS**

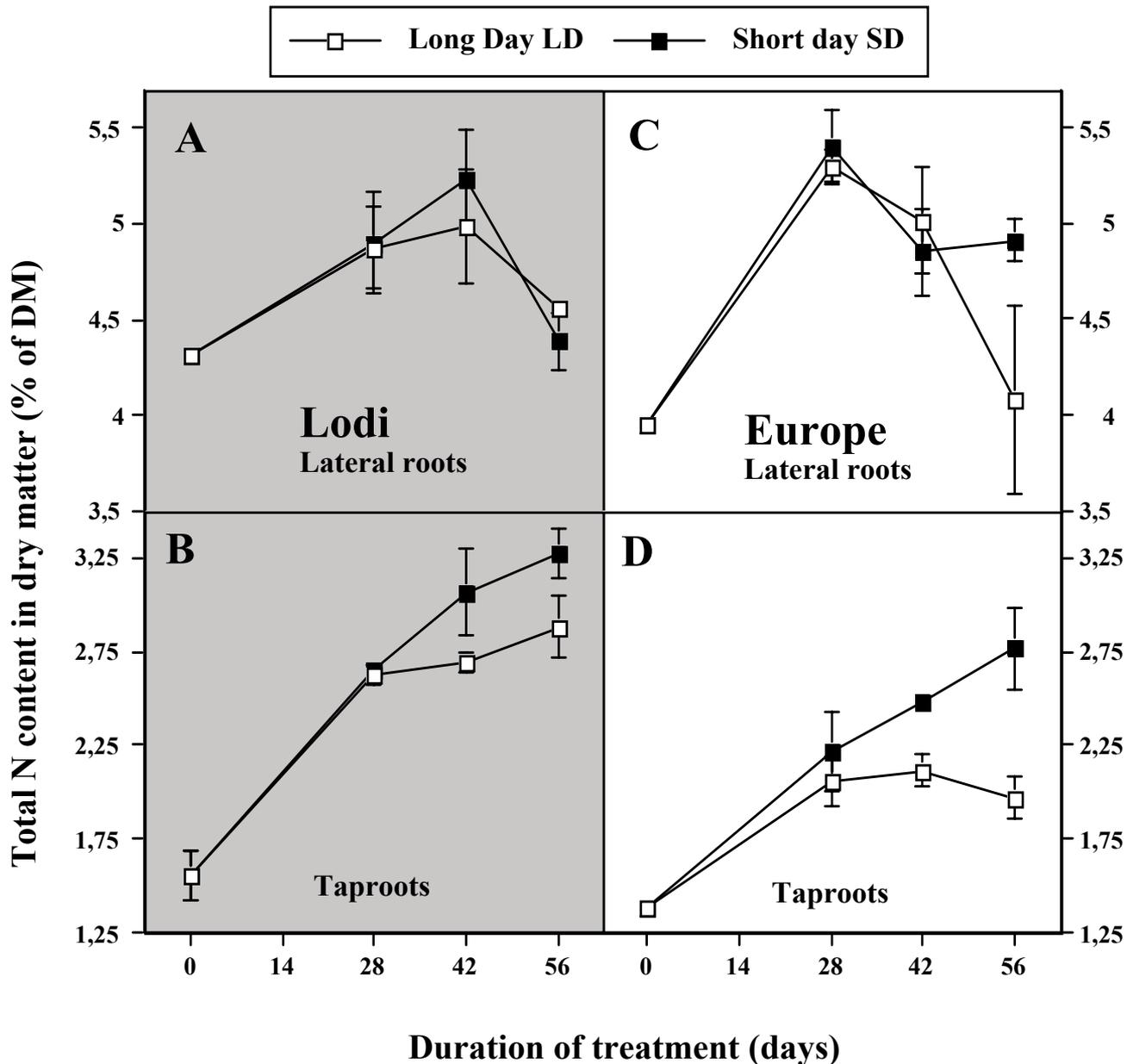
#### **III-A- Experiment I**

##### **III-A-1- Growth and shoot/root ratio**

When compared with plants exposed to long-day (LD) conditions, short-days (SD) strongly reduced shoot re-growth ( $p < 0.05$ ; Figure IV-1) and shoot / root ratio of both varieties. For example, biomass production reached 6 g plant<sup>-1</sup> in LD vs only 3 g plant<sup>-1</sup> in SD treatments, for Europe after 28 d (Figure IV-1B). At the end of the experiment, total dry matter of SD plants was about 3-fold lower than LD plants for Lodi (12.8 vs 4.6 g.plant<sup>-1</sup>, Figure IV-1A) and Europe (19.7 vs 6.4 g.plant<sup>-1</sup>, Figure IV-1B). Moreover, shoot / root ratio of Lodi plants in SD conditions also was strongly decreased (1.57) in comparison with LD conditions (2.08) because shoot growth was more severely decreased than root growth after 28 d of treatment (Figure IV-1A). When compared with Lodi, the effect of SD on shoot / root ratio was stronger in Europe where it was reduced 2-fold after 42 d of re-growth (from 3.8 for LD plants to 1.8 for SD plants, Figure IV-1B).

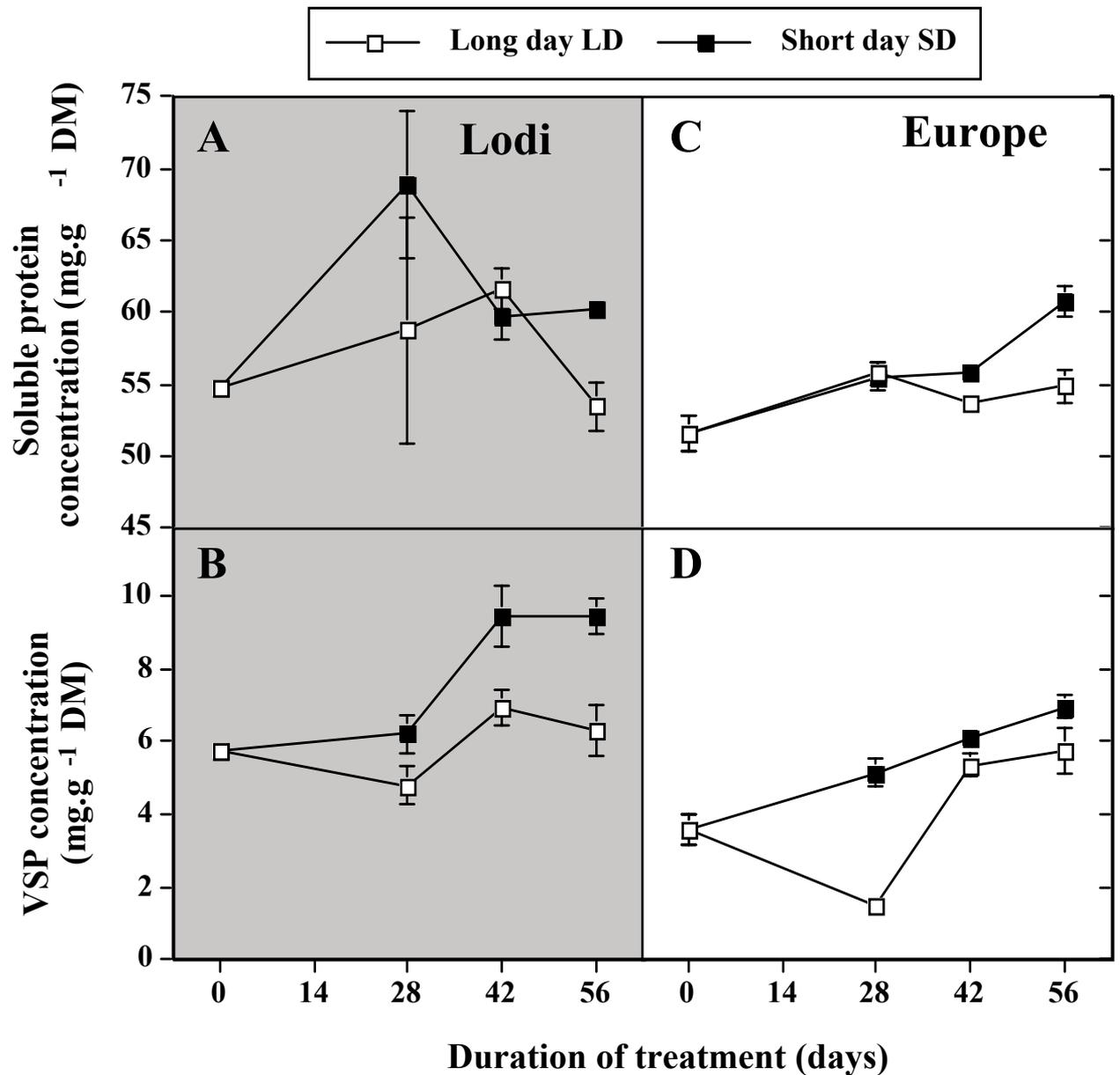
##### **III-A-2- Total N, N uptake and N partitioning in plant**

Compared with LD plants, total plant N was strongly reduced in SD plants from 28 d onward (Table IV-1). Moreover, total plant N was similar between Lodi and Europe cultivars up to 42 d in each photoperiod treatment. The SD effect was stronger for Lodi plants than for Europe plants for both 42 d and 56 d exposure to treatment (Table IV-1). As expected, the observations relating to SD effect on total plant N were confirmed by N uptake estimated using the <sup>15</sup>N-labelling method (Figure IV-2), since N uptake was strongly reduced after 28 d of SD treatment irrespective of the cultivar. In addition, it also appeared that treatment duration increased differences between SD and LD conditions. Thus, for 56 d of SD treatment, N uptake was 2- and 3-fold lower for Europe and Lodi, respectively (Figure IV-2). Furthermore, SD increased the relative partitioning of N uptake from shoots to taproots for both cultivars (Figure IV-3). When plants were exposed to SD treatments for 56 d, partitioning of N towards re-growing shoots was reduced from 68 % (LD) to 55 % (SD) for Lodi and from 77 % (LD) to 66 % (SD) for Europe (Figure IV-3). Consequently, SD conditions led to a preferential partitioning of N to taproots in comparison with LD conditions (19 vs 9 % for Lodi and 12 vs 5 % for Europe after 28 d of treatment, Figure IV-3). Irrespective of cultivar, changes in N partitioning were most noticeable in taproots for SD treatment. Throughout the 56 d in SD conditions, the percentage of N derived from uptake allocated to taproots was twice that observed in LD plants. By comparison, partitioning of N to lateral roots remained unchanged during the initial 42 d, increasing strongly only for 56 d in Europe plants (20.5 % in SD vs 14 % in LD conditions, Figure IV-3).



**Figure IV-4** : Effects of photoperiod on total N concentration of lateral roots (A, C) and taproots (B, D) of two cultivars of *Medicago sativa* L. (Lodi and Europe) after 28, 42 and 56 d of exposure to photoperiod treatments. Total N content is expressed as the percentage of dry matter for each organ. LD : long-day photoperiod (16h light-8h darkness) ; SD : short-day photoperiod (8h light-16h darkness). Values indicate the mean  $\pm$  S.E. for n=3.

**Figure IV-4** : Effets de l'héméropériode sur la teneur en azote total des racines latérales (A, C) et des pivots (B, D) chez deux variétés de *Medicago sativa* L. (Lodi and Europe) après 28, 42 et 56 jours d'exposition aux variations d'héméropériode. Les teneurs en azote total sont exprimées en pourcentage de la matière sèche pour chaque organe. LD : jours longs (16h jour-8h nuit); SD : jours courts (8h jour-16h nuit). Les valeurs indiquent la moyenne  $\pm$  S.E. pour n=3.



**Figure IV-5 :** Effects of photoperiod on soluble protein concentration (A, C) and VSP concentration (B, D) in taproots of two cultivars of *Medicago sativa* L. (Lodi and Europe) after 28, 42 and 56 d of exposure to photoperiod treatments. **LD** : long-day photoperiod (16h light-8h darkness) ; **SD** : short-day photoperiod (8h light-16h darkness). Vertical bars indicate the mean  $\pm$  S.E. for n=3.

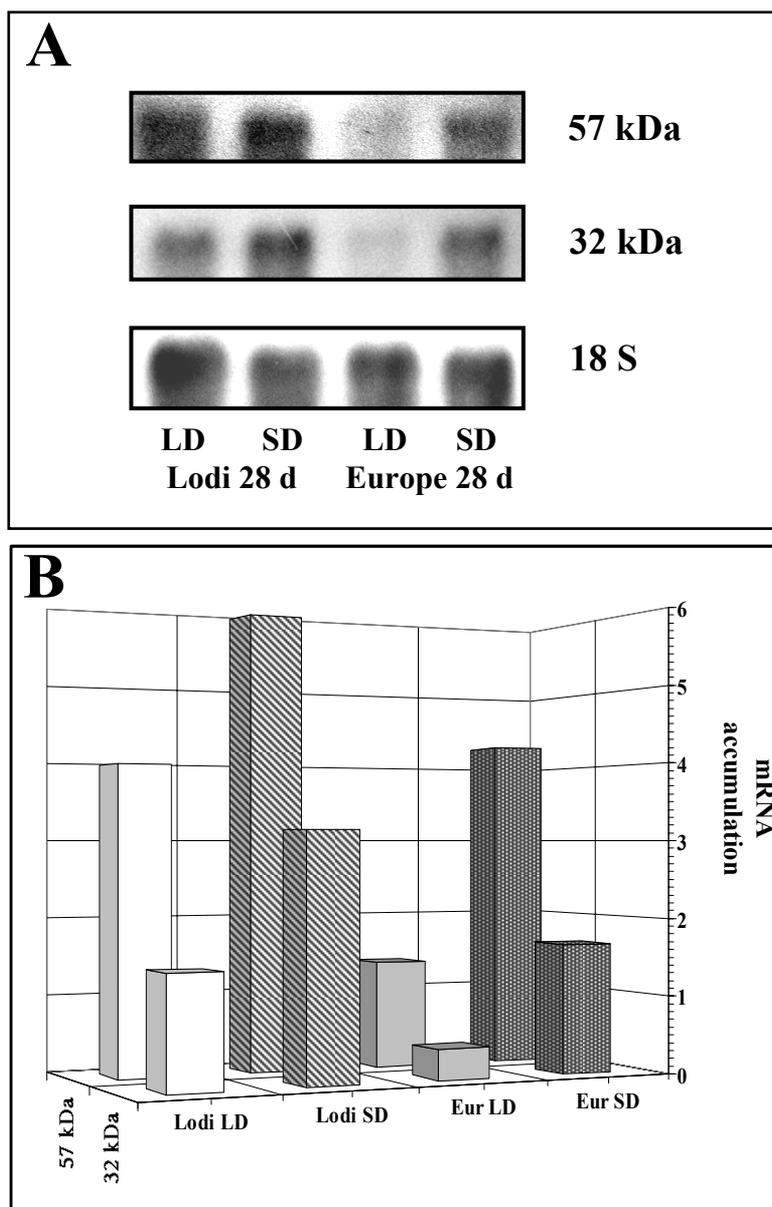
**Figure IV-5 :** Effets de l'héméropériode sur la teneur en protéines solubles (A, C) et la teneur en VSP (B, D) du pivot chez deux variétés de *Medicago sativa* L. (Lodi and Europe) après 28, 42 et 56 jours d'exposition aux variations d'héméropériode. **LD** : jours longs (16h jour-8h nuit); **SD** : jours courts (8h jour-16h nuit). Chaque barre verticale indique l'écart-type de la moyenne pour n=3.

### **III-A-3- Total N, soluble protein contents and VSP accumulation in roots**

Percent N in lateral roots of Lodi was not significantly different between SD and LD plants (Figure IV-4A). Similar results were observed for Europe except at 56 d of SD conditions (Figure IV-4C). By comparison, percentage N in taproots was higher after 42 d under SD than LD conditions for both cultivars (Figure IV-4B and IV-4D). In addition, for a given photoperiod treatment the percentage N in taproots of Lodi was always higher than that in Europe (Figure IV-4B, D). For both cultivars, the soluble protein concentrations in taproots were unaffected by photoperiod during the initial 42 d of treatment (Figure IV-5A, C). However, after 56 d, taproot protein concentrations of both cultivars were significantly ( $p < 0.05$ ) greater in SD when compared with LD. Soluble protein concentration reached  $60 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$  for plants grown in SD conditions vs  $54 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$  for LD treatment in both Lodi and Europe (Figure IV-5A and IV-5C). In comparison with day 0, there was a significant reduction of VSP concentration in taproot of Europe plants grown under LD conditions during 28 d. Similar result was observed after 28 d, with a smaller magnitude for Lodi plants exposed to LD photoperiod. These data suggested that during this period of re-growth (day 0-28 of LD treatment) mobilization of VSP was greater than synthesis. When compared to LD plants, VSP accumulation was initiated earlier (after 28 d) for SD plants ( $6.2$  vs  $4.8 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$  for Lodi ; Figure IV-5B and  $5.1$  vs  $1.4 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$  for Europe ; Figure IV-5D). This photoperiod-induced difference in VSP accumulation was maintained for both varieties irrespective of photoperiod treatment duration, with VSP concentrations significantly higher ( $p < 0.05$ ) for SD-treated plants than for LD-treated plants. For example, taproot VSP concentration for Lodi showed a 33 % increase after 42 d of SD treatment reaching  $9.4 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DM}$  (Figure IV-5B). During the 56 d in SD conditions, VSP concentrations in taproot of Europe were 20 % higher than those of plants in the LD treatment ( $6.9$  vs  $5.7 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$  ; Figure IV-5D). Lodi had higher taproot VSP concentrations than Europe irrespective of the photoperiod treatment duration. For example, after 42 d in SD, VSP concentrations reached  $9.4 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$  in Lodi taproots (Figure IV-5B) vs  $6.1 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$  for Europe taproots (Figure IV-5D).

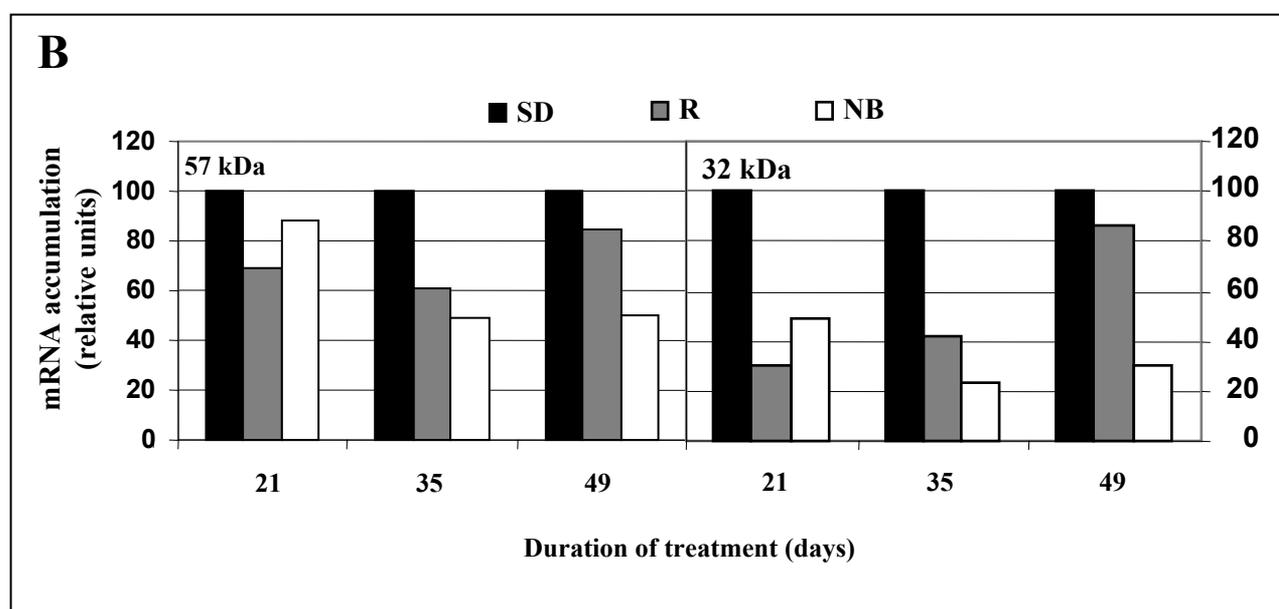
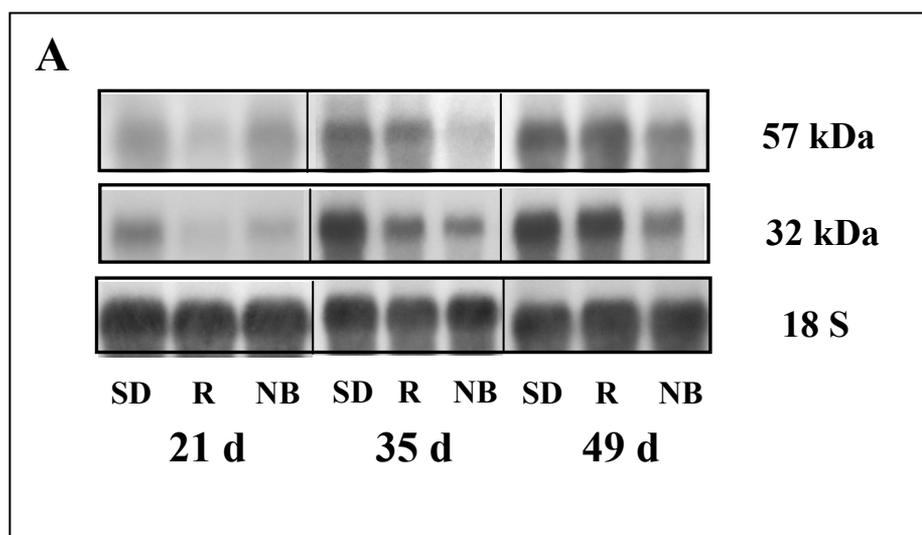
### **III-A-4- *vsp 32* and $\beta$ -amylase (*vsp 57*) transcripts levels**

After 28 d of treatment, taproot  $\beta$ -amylase (*vsp 57*) and *vsp 32* mRNA levels were higher under SD than LD conditions for both cultivars (Figure IV-6A and B). However, the increase was more noticeable for *vsp 32* than for  $\beta$ -amylase in both varieties (Figure IV-6A). Thus, the *vsp 32* and  $\beta$ -amylase mRNA levels in taproots of Lodi were 2.2- and 1.5-fold higher for SD than for LD plants, respectively (Figure IV-6B). Moreover, this induction of VSP transcripts by SD was greater in taproots of Europe than for Lodi plants for both VSP transcripts (Figure IV-6B). For instance, the accumulation of *vsp 32* mRNA was increased 3-fold by SD treatment in Europe



**Figure IV-6 : A-** Effects of photoperiod on steady-state transcript levels for the vsp 57 and vsp 32 vegetative storage proteins in taproots of two cultivars of *Medicago sativa* L. (Lodi and Europe) after 28 d of exposure to photoperiod treatments. **LD** : long-day photoperiod (16h light-8h darkness); **SD** : short-day photoperiod (8h light-16h darkness). **A-** Northern blot experiments using vsp 57 or vsp 32 <sup>32</sup>P-labelled probes and 5 µg of total RNA extracted from taproots; an 18 S ribosomal RNA probe was used as a RNA loading control. **B-** Relative abundance of the vsp 57 and vsp 32 transcripts level quantified using phosphor imager, and results presented as a ratio between vsp 57 and vsp 32 transcript level and 18 S transcript level. Each lane was loaded with total RNA extracted from combined taproot samples of three different replicates.

**Figure IV-6 : A-** Effets de l'héméropériode sur le niveau d'expression des transcrits vsp 57 et vsp 32 des protéines des organes végétatifs du pivot chez deux variétés de *Medicago sativa* L. (Lodi et Europe) après 28 jours d'exposition aux variations d'héméropériode. **LD** : jours longs (16h jour-8h nuit); **SD** : jours courts (8h jour-16h nuit). **A-** Hybridation avec les sondes vsp 57 or vsp 32 marquées au <sup>32</sup>P après northern blot de 5 µg d'ARN total extraits à partir de pivot ; une sonde codant pour l'ARN 18 S ribosomal a été utilisée pour contrôler le chargement en ARN. **B-** Abondance relative des niveaux de transcrits vsp 57 and vsp 32 quantifiés par phosphor imager, les résultats présentent le rapport entre les niveaux de transcrits de vsp 57 et vsp 32 et le niveau de transcrits 18 S. Chaque piste a été chargée avec les ARN totaux extraits à partir d'échantillons combinés de pivot issus de trois répétitions.



**Figure IV-7** : Effects of night breaks on steady-state transcript levels for the *vsp 57* and *vsp 32* vegetative storage proteins in taproots of *Medicago sativa* L. (Europe) after 21, 35 and 49 d of exposure to either **SD** : short-day photoperiod (8h light-16h darkness) or SD supplemented with night breaks : (**NB**) (15 min of sodium high pressure light) or (**R**) (15 min of sodium high pressure light + red light filter). Each night break was given nightly during the middle of the dark cycle. **A**- Northern blot experiments using *vsp 57* or *vsp 32* <sup>32</sup>P-labelled probes and 5 µg of total RNA extracted from taproots; an 18 S ribosomal RNA probe was used as a RNA loading control. **B**- Relative quantification of level of the *vsp 57* and *vsp 32* transcripts. Results are given as percentage of transcript level of *vsp 57* and *vsp 32*, respectively, observed in SD plants. Each lane was loaded with total RNA extracted from combined taproot samples of three different replicates.

**Figure IV-7** : Effets de l'interruption de la phase nocturne sur le niveau d'expression des transcrits *vsp 57* et *vsp 32* des protéines des organes végétatifs du pivot chez *Medicago sativa* L. (Europe) après 21, 35 et 49 jours d'exposition en héméropériode courte (**SD** : 8h jour -16h nuit) ou SD associé à une interruption de la nuit : (**NB**) (15 min de lumière blanche dispensée par des lampes à sodium haute pression) ou (**R**) (15 min de lumière blanche dispensée par des lampes à sodium haute pression + application d'un filtre de lumière rouge). Les flash lumineux sont appliqués chaque nuit au milieu du cycle nocturne. **A**- Hybridation avec les sondes *vsp 57* ou *vsp 32* marquées au <sup>32</sup>P après northern blot de 5 µg d'ARN total extraits à partir de pivot ; une sonde codant pour l'ARN 18 S ribosomal a été utilisée pour contrôler le chargement en ARN. **B**- Quantification relative des niveaux de transcrits *vsp 57* and *vsp 32*. Les résultats sont exprimés en pourcentage du niveau de transcrit de *vsp 57* et *vsp 32* respectivement, observés chez des plantes placées en jours courts (SD). Chaque piste a été chargée avec les ARN totaux extraits à partir d'échantillons combinés de pivot issus de trois répétitions.

vs a 2.2-fold increase in Lodi taproots. This suggests that  $\beta$ -amylase and *vsp 32* gene expression or transcript stability is more responsive to SD exposure in Europe than in Lodi taproots (Figure IV-6).

### **III-B- Experiment II**

#### **Phytochrome involvement :*vsp 32* and $\beta$ -amylase (*vsp 57*) transcripts levels**

In order to study the involvement of phytochrome in alfalfa VSP accumulation under SD, Europe plants growing under SD conditions were treated with 15 min illumination either with a sodium high pressure light only (night break = NB) or plus red light filter (R) supplied in the middle of the dark period during 21, 35 and 49 d (Figure IV-7). Compared with SD plants, NB or R treatments strongly decreased both taproot  $\beta$ -amylase (*vsp 57*) and *vsp 32* mRNA levels (Figure IV-7A and B). Thus, after 21 d of treatment, a 2- and 3-fold decrease occurred in *vsp 32* mRNA level for NB and R plants, respectively. A decrease in *vsp 57* mRNA levels was also observed, but to a lesser extent than for *vsp 32* mRNA. For example, after 35 d, *vsp 32* and *vsp 57* mRNA levels were 75 % and 50 % lower for NB than for SD plants, respectively (Figure IV-7B). The negative effect of NB on mRNA accumulation was maintained or increased during the treatment for both *vsp 32* and *vsp 57*. After 35 d, both *vsp 32* and *vsp 57* mRNA transcripts increased in R-treated plants, but were always lower than mRNA levels of SD plants.

## **IV- DISCUSSION**

The present work investigates both quantitative and qualitative effects of short day on the kinetics of growth, N partitioning within the plant and N storage as protein in taproots of two alfalfa cultivars (Lodi and Europe). Our data clearly show that shortening the photoperiod from 16 to 8h results in a rapid (after 28 d of treatment) reduction in alfalfa growth due, in large part, to a significant reduction in shoot growth for both cultivars. These observations are consistent with previous studies (Sato, 1974 ; Philippot *et al.*, 1991) showing that SD significantly reduced the shoot / root ratio by decreasing alfalfa shoot growth. In addition, when compared to LD treatment, root biomass also is lower, N uptake rate is significantly decreased and the partitioning of exogenous N within the plant is markedly modified for plants grown in SD conditions. After 28 d, relative N partitioning to the taproot was doubled under SD conditions. Consequently, the percentage of N in taproots increased significantly but the concentration of soluble protein in taproots was similar between SD and LD plants after 28 d of treatment. Nevertheless, our results show that SD conditions lead to a significant increase of taproot VSP concentrations for both alfalfa genotypes after 28 d, showing that VSP accumulation begins earlier than accumulation of the total soluble protein pool in taproots of these cultivars. This

suggests that VSP accumulation is more responsive, in a temporal sense, to reduction in photoperiod.

Our observations show that short-day exposure significantly affects the biomass partitioning between shoot and root tissues and involves a preferential N allocation to storage organs, leading to VSP accumulation in taproots. This suggests that VSP accumulation in alfalfa taproots could be modulated by the source-sink status for N within the plants. In LD conditions, rapidly growing leaves and stems of alfalfa are strong N sinks, while root tissues act as source organs for N, and accumulate less VSP. When plants are exposed to SD conditions, shoot growth slows and the shoot N demand decreases proportionately. Consequently, the partitioning of N to shoots decreases with continued SD exposure, and N is preferentially translocated to taproot tissues and sequestered as VSP. Similar observations have been reported in soybean (Staswick, 1994 ; Bunker *et al.*, 1995), in potato (Paiva *et al.*, 1983 ; Wenzler *et al.*, 1989) and poplar (Coleman *et al.*, 1992). In soybean, VSPs accumulate in leaves at flowering, and are mobilized to sustain the growth of seeds during pod-filling (Wittenbach, 1983). The removal of soybean pods, which are normally strong N sinks, leads to VSP accumulation in young leaves (Tranbarger *et al.*, 1991 ; Bunker *et al.*, 1995). In potato, the VSP called patatin normally accumulates to high level in tubers, but can accumulate to high concentrations in above-ground stems and petioles if developing tubers or axillary buds are removed, especially in SD conditions (Paiva *et al.*, 1983). Similarly, source-sink interactions appear to modulate VSP accumulation in poplar. In spring, developing leaves and shoots of poplar are significant N sinks (Dickson *et al.*, 1985 ; Vogelmann *et al.*, 1985). Coleman *et al.* (1993) suggested that N source-sink relationships of expanding buds and developing shoots somehow initiated the degradation and mobilization of BSP. When N sink strength is reduced by suppressing development of axillary buds of poplar exposed to LD, BSP accumulates to significant levels (Coleman *et al.*, 1993). In alfalfa, the week of shoot re-growth following defoliation is characterized by extensive mobilization of taproot N reserves, especially VSPs, to sustain the supply of amino acids needed for rapidly developing shoot tissues, which act as strong N sinks after defoliation. However, the strength of this shoot N sink declines after several weeks of re-growth as shoot growth rate declines, reproductive development begins and re-accumulation of VSPs in taproots occurs.

Results of this study also revealed that SD exposure induced the accumulation of *vsp 32* and *vsp 57* ( $\beta$ -amylase) mRNA after 28 d for both Lodi and Europe. These results are consistent with our previous observations (Noquet *et al.*, 2001) where exposure of Europe alfalfa to SD for 35 d significantly stimulated the expression of  $\beta$ -amylase transcript. These observations also agree with previous results obtained in woody species (Coleman *et al.*, 1991, 1992 ; Langheinrich and Tischner, 1991 ; Van Cleve and Apel, 1993). In comparison with Europe, the cultivar Lodi is able to rapidly re-accumulate VSP in taproots (Avice *et al.*, 1997b). This

characteristic of Lodi is confirmed by the results of the present work where Lodi taproots had higher VSP concentrations and transcripts than Europe after 28 d of LD treatment (Figures IV-5 and IV-6). However, when compared with LD conditions, the steady-state transcript levels for *vsp 32* and *vsp 57* ( $\beta$ -amylase) were more stimulated in Europe (*cv* from north of France) than in Lodi plants (*cv* from south of France and Italy) growing under SD conditions. These data clearly indicate that cultivar differences in responsiveness to photoperiod may exist for the regulation of VSP accumulation in alfalfa taproots. Vince-Prue (1975) reported photoperiodic responses change with latitude of origin of plants. These results are also consistent with recent studies on photoperiod-induced changes in *bsp* expression among several poplar genotypes (Black *et al.*, 2001) where maximum accumulation of *bsp* mRNA was induced earlier in clones native to northern latitudes than in clones native to southern latitudes. The differences in photoperiodic induction of *bsp* expression among ecotypes of poplar may constitute an adaptive response for plant N storage and N use-efficiency. In contrast, our study also shows that SD treatment induces a greater VSP accumulation in Lodi plants at the expense of growth compared with Europe (Figure IV-1 and IV-5). These differences between cultivars in protein and mRNA accumulation demonstrate that VSP regulation by SD could act at several levels, including transcriptionally and post-translationally. In order to mimic seasonal variations, twice as much photosynthetically active radiation was applied in long days as in short days in this experiment. Consequently, photoperiod and photosynthetic energy, which are tightly linked, are both factors affecting the responses of VSPs to light effect in this study.

In addition, the impact of light quality also must be explored as a result of our findings. In some deciduous woody species (particularly in poplar), several studies indicated that SD induction of VSP gene expression was partly mediated by phytochrome. Langheinrich and Tischner (1991) reported that poplar grown under SD conditions with a 15-min period of red light in the middle of the dark period accumulated less 32 kDa BSP (bark storage protein) than control plants (SD without pulses of red light). More recently, Zhu and Coleman (2001a, b) showed that *bsp* mRNA accumulation and transcriptional activation of the *bsp* promoter were inhibited under SD conditions when the dark period was interrupted with 15 min of incandescent light or red light. Using similar approaches, our results report for the first time in alfalfa (*cv.* Europe), that the phytochrome system may be involved in the regulation of VSP gene expression in taproots (Figure IV-7). These preliminary data suggest that the perception of SD at the foliar level could be phytochrome mediated before the transduction of SD signal from the shoot to the root tissues of alfalfa leading to the induction of VSP gene expression. Therefore, further investigations are necessary to determine the mechanism(s) by which phytochrome acts to enhance VSP accumulation in taproots of alfalfa plants grown in SD. For instance, it will be

interesting to study the reactions of alfalfa plants to night interruption with red vs far-red light, and the reversibility of red-light (660 nm)-induced processes by far-red light (730 nm).

In conclusion, this study presents significant results supporting our hypothesis that VSP expression is regulated directly by photoperiod and/or indirectly by alteration of N source-sink interactions as shoot growth changes in response to SD photoperiod, and brings new insights with regard to cultivar effects and the role of phytochrome in mediating these responses. Our data clearly indicate that photoperiod acts as a key environmental factor involved in N deposition (as VSPs) in alfalfa taproots during autumn and early winter. Dhont *et al.* (2003) recently studied various fall harvest treatments showing differences between VSP level of two contrasted alfalfa cultivars. Thus, removal of source leaves induced by fall harvest also reduced root organic reserves essential for successful overwintering and spring re-growth. Because SD has a central role as the primary signal (interacting with low temperature) to induce bud dormancy and cold acclimation (Thomas and Vince-Prue, 1997 ; Li *et al.*, 2002) in numerous plants, future work will determine how VSP synthesis is affected by phytohormones and other stimuli known to be involved in SD signal transduction. Moreover, a comparison of the regulation of VSP gene expression in alfalfa cultivars that differ in other characteristics such as photoperiod responsiveness, fall dormancy or cold tolerance will be considered.

## **Acknowledgments**

The authors thank Miss Marie-Paule Henry for her invaluable help in sample acquisition and IRMS analysis and Jérôme Ozouf for his contribution in VSP analysis. The authors also thank Dr. P. Rottili (Lodi, Italy) and Dr. G. Lemaire for supplying the seeds of *Medicago sativa* L. cv Lodi.

*CHAPITRE V : Effet du bouleversement des relations source-puits sur la répartition d'azote et l'accumulation d'une protéine de réserve des organes végétatifs chez Brassica napus L. (article 3)*

---

---

**CHAPITRE V :**

**EFFET DU BOULEVERSEMENT DES RELATIONS SOURCE-  
PUITS SUR LA REPARTITION D'AZOTE ET  
L'ACCUMULATION D'UNE PROTEINE DE RESERVE  
DES ORGANES VEGETATIFS CHEZ *BRASSICA NAPUS L.*  
(Article 3)**

---

**Effects of altered source-sink relationships on N allocation and vegetative storage protein accumulation in *Brassica napus L.***

Carine Noquet, Jean-Christophe Avice, Laurence Rossato, Patrick Beauclair, Marie-Paule Henry and Alain Ourry.

*Article soumis à Plant science.*

UMR INRA-UCBN 950 EVA et nutritions NCS, Institut de Recherche en Biologie Appliquée, Université, 14032 Caen Cedex, France.

*Keywords:* *Brassica napus L.*, source-sink relationships, N allocation, N cycling, vegetative storage protein, N storage buffer

## **Abstract**

Growth, N allocation and involvement of vegetative storage protein (VSP) in the temporary N accumulation were evaluated in field conditions of oilseed rape grown with altered source-sink relationships (by leaf halving or removal of stem, flowers or pods). As compared to control plants, removal of half the leaves early in the vegetative period induced delayed flowering, a lower accumulation of the taproot 23 kDa VSP and finally a decreased pod production. Stem removal, when flower buds were still covered by leaves, increased taproot biomass and its N concentration but prevented taproot VSP accumulation. Continuous removal of flowers or pods increased the shoot growth and N uptake duration (for deflowered plants). When foliar senescence finally occurred in plants continuously subjected to flower or pod removal, the N was allocated in a large proportion to buffering organs (taproot and stem) and it led to an increased and late VSP accumulation without subsequent mobilization. In control plants, N stored as VSP was remobilized during late pod filling concomitant with stem and taproot sink to source transition. A summarized scheme of N source-sink relationships during the growth cycle is presented where the 23 kDa VSP may act as an N storage buffer in response to an asynchronism between mobilization of foliar N and N requirements for seed formation.

## **Résumé**

La croissance, la répartition d'azote et l'implication de la VSP dans l'accumulation temporaire d'azote ont été évaluées en conditions de plein champ chez le colza suite à un bouleversement des relations source-puits (par suppression de la moitié des feuilles de la rosette, ou suppression de la hampe, des inflorescences ou des siliques). En comparaison avec les plantes témoin, l'ablation de la moitié des feuilles de la rosette intervenant de façon précoce pendant la période végétative, retarde la période de floraison, induit une plus faible accumulation de la VSP de 23 kDa dans le pivot et conduit finalement à une diminution de la production de siliques. La suppression de la hampe alors que les boutons sont accolés et cachés par les feuilles terminales, augmente la biomasse du pivot et sa teneur en azote mais empêche l'accumulation de la VSP dans cet organe. L'ablation continue des fleurs et des siliques augmente la croissance aérienne et la période d'absorption de l'azote (pour les plantes sans inflorescences). Quand la sénescence foliaire intervient finalement chez les plantes soumises de façon continue à la suppression des inflorescences et des siliques, l'azote est largement réparti vers les organes "tampon" (pivot et hampe) et aboutissant à une

accumulation plus importante et plus tardive de la VSP sans qu'elle soit remobilisée ensuite. Chez les plantes témoin, l'azote stocké sous forme de VSP est remobilisé plus tard lors du remplissage des siliques au moment du passage du statut de puits à source de la hampe et du pivot. Un schéma résumant les relations source-puits pour l'azote au cours du cycle de développement est présenté et dans lequel il est suggéré que la VSP de 23 kDa pourrait agir en tant que "réserve azotée tampon" en réponse à un décalage entre la mobilisation de l'azote foliaire et les besoins en azote de la plante pour la formation des graines.

## **I- INTRODUCTION**

Despite a relatively high efficiency of mineral N uptake from the soil, oilseed rape (*Brassica napus* L.) is also known for its low nitrogen harvest index. Although high rates of N fertilizer are usually applied to oilseed rape crops in order to obtain maximum seed yield, the contribution of fertilizer to total N content is higher in vegetative than in reproductive shoot components (Schjoerring *et al.*, 1995). Fertilizer application during the reproductive phase results in a low efficiency of N utilization and has the potential risk of losses to the environment. In addition, leaves shed before flowering contain a significant amount of N, usually exceeding 2 % of their dry weight (Rossato *et al.*, 2001). The resulting low N harvest index could be due to sink strength limitation rather than to unavailability of N, even though deficiency in amino acid transport or in N compound degradation could also be implied.

Rossato *et al.* (2001) have reported that during flowering and pod development stages, the capacity for N uptake significantly declines. Consequently, most N used for grain filling derives from mobilization of stored N in vegetative tissues. Additionally, these authors have shown that during flowering transient N storage occurs in the taproot of oilseed rape, especially as a polypeptide of 23 kDa. Because this protein is accumulated during flowering and is fully hydrolyzed during N filling of the grain, it has been characterized as a vegetative storage protein (VSP). VSP have been identified in several herbaceous plants (for review see Staswick, 1994 ; Ourry *et al.*, 2001 ; Bewley, 2002) and woody species (Stepien *et al.*, 1994 ; Rowland and Arora, 1997 ; Van Damme *et al.*, 2002 ; Gomez and Faurobert, 2002).

Depending on plant species, numerous studies reported that VSP synthesis can be elicited by different environmental conditions or signals. These include water deficiency, N availability, wounding, methyl-jasmonate, sugars, light (Staswick, 1990 ; Berger *et al.*, 1995 ; Rossato *et al.*, 2002a,b ; Meuriot *et al.*, 2003b), photoperiod (Coleman *et al.*, 1993 ; Noquet *et al.*, 2001, 2003). VSP synthesis can also be developmentally regulated ; i.e. related to the organ source-sink status for N. As previously described in soybean leaves (Wittenbach, 1983 ; Staswick, 1989), VSP acts as a transient deposit of amino acids resulting from either the limitation of strong sink organs or massive degradation of abundant proteins such as RubisCO during leaf senescence (Mira *et al.*, 2002). Thus, Wittenbach (1982, 1983) indicated a change in leaf status following pod removal, from a source organ with photosynthesizing function to a sink organ leading to N deposition. Indeed, VSP  $\alpha$  and VSP $\beta$  accumulate in soybean leaves to high levels (about 50 % of the total leaf protein) after the removal of seed

Pods (Mason and Mullet, 1990 ; Staswick, 1990 ; Franceschi and Grimes, 1991) suggesting that their storage is modulated by the relative capacities of source and sink tissues. Moreover, N can be transiently stored as a specialized vegetative storage protein termed bark storage protein (BSP) in overwintering organs (tissues of shoot axis and roots) of several woody species (Harms and Sauter, 1994). For instance, the regulation of poplar BSP synthesis may be related to source-sink relationships providing similarities to soybean since the BSP induction occurs when autumnal leaf senescence begins and their degradation and mobilization are triggered to supply N during spring growth resumption when developing leaves and shoots are significant sinks for N (Coleman *et al.*, 1993).

Additionally, it is well known that senescence, which represents the final stage of leaf development, has an important role with respect to remobilization of stored N (Thomas *et al.*, 2002 ; Hörtensteiner and Feller, 2002 ; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003). Correlation between protein storage and leaf senescence, otherwise, has been demonstrated by Sauter and Van Cleve (1991) after an attack of the fungus *Melampsora* on *Populus x canadensis* which induced premature leaf senescence and a seasonal abnormal increase of protein content in wood tissue. The rate of senescence and leaf N remobilization are also related to the N nutrition status of the plant (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003) and to source-sink relations (Hörtensteiner and Feller, 2002). In oilseed rape, VSP synthesis could also be associated with leaf senescence (which mostly occurs early before flowering) in relation to changes in organ source-sink status. Alternative sinks such as vegetative organs (stem and taproot) could then constitute a transient N storage buffer between N losses from senescing leaves (while sink strength of developing seeds is too low) and later grain filling.

In order to better understand the dynamics of N accumulation, its allocation and its further remobilization for grain filling, source-sink relationships among vegetative and reproductive organs of oilseed rape need to be clarified. To do this, a field experiment was performed where source-sink relationships were altered at various developmental stages. The experiment was planned to investigate i) the N leaf allocation prior to flowering, its importance for subsequent pod formation and the involvement of VSP as N storage buffer during transition between vegetative and reproductive development, ii) the role of stem as a N buffering organ and consequences of its removal on VSP accumulation, iii) the potential increase in N allocation towards alternative sinks following the removal of reproductive tissues. Using  $^{15}\text{N}$  labelling method, allocation of N taken up gives insight on course of major sink organs along development. Taken together, kinetic studies on biomass, N allocation and

VSP accumulation allow us to build up a scheme of N source-sink relationships and further N cycling during the growth cycle.

## **II- MATERIALS AND METHODS**

### **II-A- Experimental site**

The experiment took place in the growing season of 2001 on a field plot located on a clay soil near Ouistreham, Calvados, France (49°16' N, 0°15' W). Winter oilseed rape (*Brassica napus* L. cv. Capitol) was sown on the 10 September 2000. The field received 379 mm of precipitation from March 2001 to July 2001. Average monthly temperatures were 9.1 °C in March, 9.9 °C in April, 12.8 °C in May, 15.8 °C in June, and 17.9 °C in July. N fertilization was applied as 75 kg.ha<sup>-1</sup> on 15 February and 150 kg.ha<sup>-1</sup> on 30 March. Pest and diseases were controlled such that crop damage was negligible.

### **II-B- Experimental procedure and harvest**

The experiment was laid out in a split plot design (16 m<sup>2</sup> per plot) with harvest dates as the main plot and treatments as sub-plot. The experiment was performed on untreated, control plants and on plants altered in their development *via* the modifications of source-sink relationships. Four treatments were applied through developmental stages: (a) stem removal ; (b) leaf halving (removal of half the leaves) ; (c) flower removal or (d) pod removal. Treatments a and b were conducted at the beginning of bolting. In treatment a, stems were cut 6 cm above the ground level when flower buds were still covered by leaves (on 27 February). In treatment b, half of the leaves (which are normally considered as a source organ during the flowering and pod development) were cut when the stem was 20 cm high (on 14 March). In treatment c, flowers were continuously removed from 14 March until the end of June. Finally, treatment d involved the continuous removal of pods from 26 April (beginning of pod development) until the end of June (corresponding to pod maturity stage in control plants).

For all treatments, each plant was individually fertilized 7 d before each harvest date with <sup>15</sup>N labelled nitrogen (supplied as K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub> at 10 atom % <sup>15</sup>N excess). The required amount of K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub> for a 5 kg N.ha<sup>-1</sup> solution was diluted in distilled water and carefully

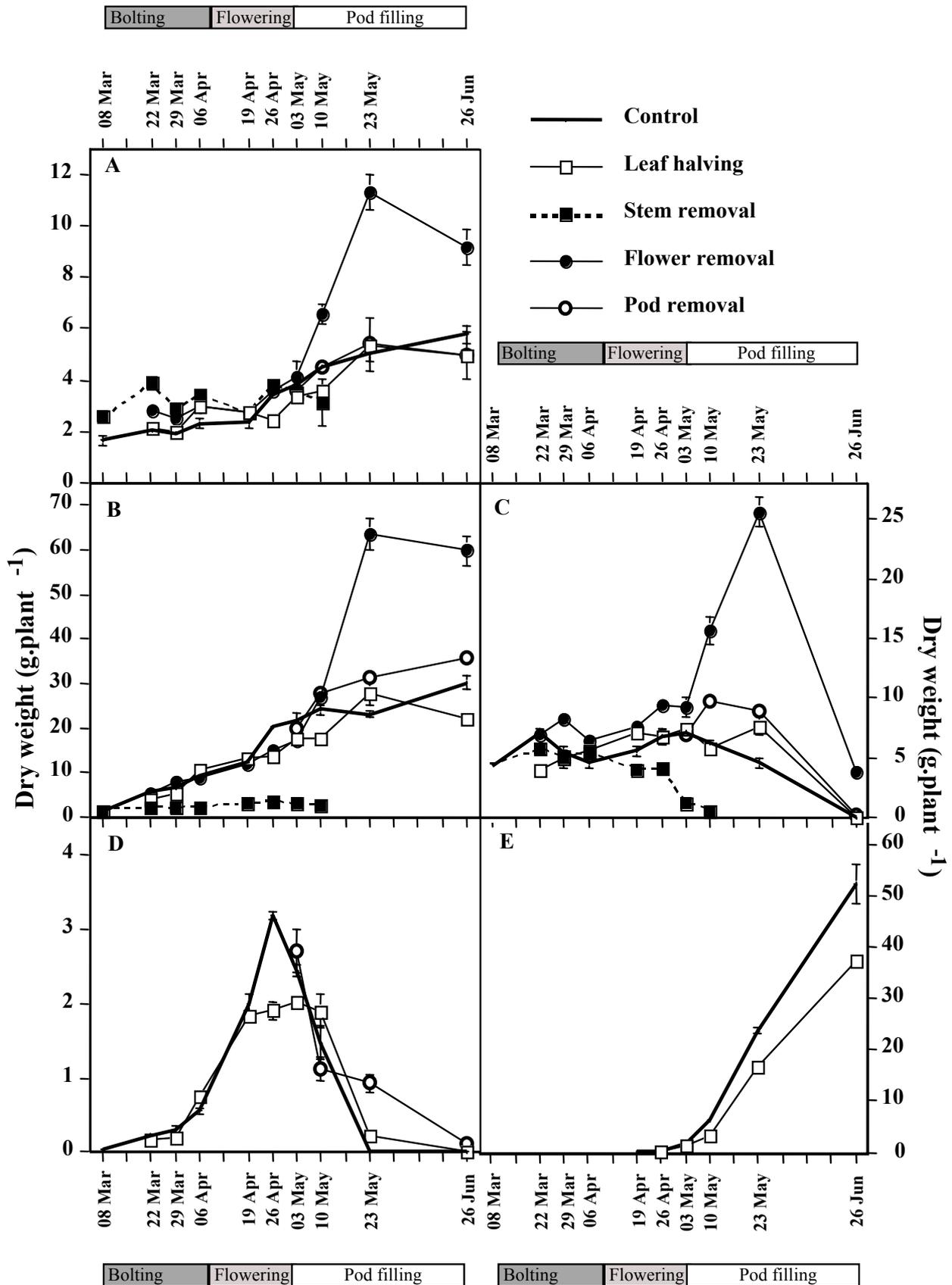
applied to the soil around each plant (1.5 L.plant<sup>-1</sup>, 400 cm<sup>2</sup>). The average number of plants per m<sup>2</sup> was 39±0.74. Flowering of control plants started on the 10 April and was completed on the 10 May. Plants were harvested on 8, 22, 29 March, 6, 13, 19, 26 April, 3, 10, 17, 23 May and 26 June. Each harvest date corresponded to a developmental stage change in control plants from the bolting stage to the pod maturity stage. At each harvest date, three replicates of three plants were separated into lateral roots, taproots, leaves, stems, flowers, and pods. One subsample of each plant tissue was used for fresh weight determination, freeze-dried, reweighed for dry weight determination, and then, ground to a fine powder for isotopic analysis. A second subsample was weighed, immediately frozen in liquid N<sub>2</sub> and kept at -80 °C until SDS-PAGE and western-blot analysis of soluble proteins.

### **II-C- N and <sup>15</sup>N analysis**

Despite variations in the capacity of mineral N uptake at different harvest dates, the amount of available <sup>15</sup>NO<sub>3</sub> was assumed to be similar for all plants for a given fertilization date. Then, comparison between treatments is possible for a given harvest date. Quantification of <sup>15</sup>N was a measure of the amount of N taken up during 7 d before each harvest and could be distinguished from unlabelled, endogenous N present prior to labelling. In addition, allocation of newly taken up N during 7 d (labelled N) within plant tissues could be calculated for a given treatment. The total N and <sup>15</sup>N in the plant samples were determined with a continuous flow isotope mass spectrometer (Twenty-twenty, PDZ Europa Scientific Ltd, Crewe, UK) linked to a C/N analyser (Roboprep CN, PDZ Europa Scientific Ltd). Natural <sup>15</sup>N abundance (0.3663±0.0004%) of atmospheric N<sub>2</sub> was used as reference for <sup>15</sup>N analysis. Therefore, atom % <sup>15</sup>N excess [*E* (%)] in a given tissue was obtained by  $E (\%) = A (\%) - 0.3663$ , where *A* (%) is tissue <sup>15</sup>N abundance given by mass spectrometry.

### **II-D- Electrophoretic analysis of soluble proteins**

Soluble proteins were extracted and analysed by SDS-PAGE as previously described (Rossato *et al.*, 2001). Electrophoretic transfer of proteins from SDS-PAGE gels onto PVDF membrane (Immobilon-P, Proteogene, Saint-Marcel, France) and immunodetection of the 23 kD VSP was conducted according to the protocol described previously (Rossato *et al.*, 2002b). All gels and blots were analysed by computerized image analysis (Biocapt, Bio1-D, Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France). The gels and blots were scanned. For gels, the



**Figure V-1** : Effects of removing stem, flowers, pods or half the leaves on the biomass distribution within plants in taproot (A), stem or remaining stem (B), green leaves (C), flowers (D) and pods (E) of *Brassica napus* L.. Vertical bars, when large enough, indicate the mean  $\pm$  S.E. for n=3.

**Figure V-1** : Effets de la suppression de la hampe, des inflorescences, des siliques ou de la moitié des feuilles de la rosette sur la distribution de la biomasse dans le pivot (A), la hampe ou le reste de la hampe (B), les feuilles vertes (C), les inflorescences (D) et les siliques (E) chez *Brassica napus* L.. Les barres verticales apparaissent lorsqu'elles sont suffisamment grandes et indiquent l'écart type de la moyenne pour n=3.

individual staining intensities of each polypeptide were expressed as a percentage of the total staining intensity of the corresponding lane. For blots, the 23 kDa staining intensity for treatments was given as a percentage of the maximum value for control plants.

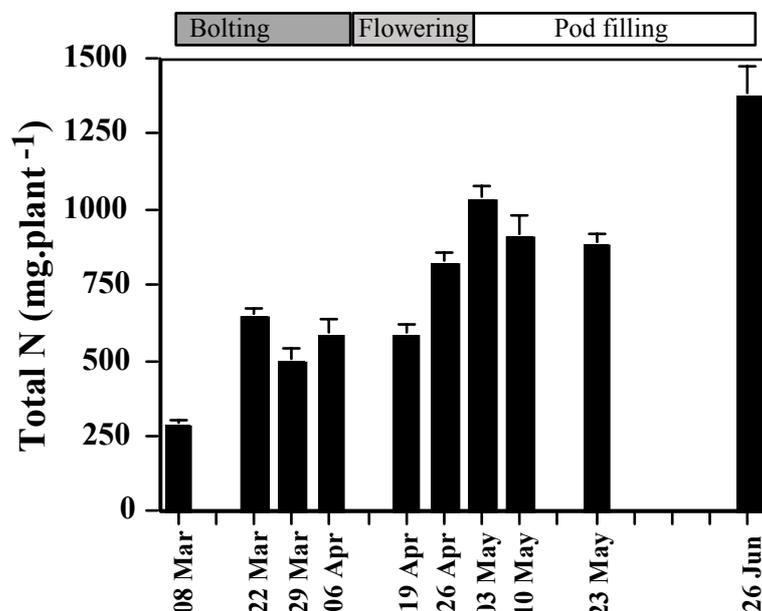
### **II-E- Statistical analysis**

Results are presented as the mean  $\pm$  SE for  $n=3$ . For soluble protein analysis (gels and blots), results were given from the combined extracts of three replicates, each containing three plants. The effects of treatments were studied by comparison of the mean using a student's  $t$ -test (Staview Student software, Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA).

## **III- RESULTS**

### **III-A- Biomass accumulation**

Biomass distribution among organs represents a first step to understand changes induced in source-sink relationships within the plant by source or sink removal. Compared to control plants, leaf halving led to i) a decrease in flower biomass (Figure V-1D): 1.9 versus 3.2 g.plant<sup>-1</sup> for control plants on 26 April (i.e. full flowering) ; ii) a flowering period that lasted into May (still 0.2 g.plant<sup>-1</sup> on 23 May ; figure V-1D) and iii) a reduction of pod biomass (-30 % ; figure V-1E) in the final harvest (26 June). In response to stem removal, the taproot biomass rapidly increased (Figure V-1A) during bolting. For instance, on 29 March, the taproot biomass of stem removed plants was 50 % higher than control plants. In deflowered plants, vegetative tissue development was greatly enhanced. Thus, taproot, stem and leaf biomass (Figure V-1A, B, C) increased rapidly after the removal of this reproductive sink. For example leaf biomass (Figure V-1C) was higher than control plants from 29 March onwards and the difference was enhanced with the treatment duration (+150 % on 10 May). Some green leaves were still attached to the stem in the end of June (3.7 g.plant<sup>-1</sup> ; figure V-1C) whereas no leaf remained in control plants. Additionally, in June, stem biomass of deflowered plants (60 g.plant<sup>-1</sup> ; figure V-1B) was 2 fold higher than for control plants. Stem and leaf biomass of depodded plants also increased rapidly after the beginning of treatment (even though to a lesser extent than for deflowered plants): +35 % for stem on 23 May (Figure V-1B) and +96 % for leaf (Figure V-1C), as compared with control plants. Moreover,



**Figure V-2** : Total N amount (mg.plant<sup>-1</sup>) in control plants during the growth cycle. Vertical bars indicate the mean  $\pm$  S.E. for n=3.

**Figure V-2** : Quantité d'azote total (mg.plant<sup>-1</sup>) des plantes témoin pendant le cycle de culture. Les barres verticales indiquent l'écart type de la moyenne pour n=3.

**Tableau V-I** : Percentage variations in total N amount measured in plants subjected to leaf halving or flower or pod removal as compared with total N amount in control plants (Figure V-2). The results given were obtained during beginning of flowering (6 April), flowering (26 April), beginning (10 May) and end (26 June) of pod filling in control plants. Each value indicates the mean  $\pm$  S.E. for n=3. NS = non significant.

**Tableau V-I** : Pourcentage de variations des quantités d'azote total mesurés chez les plantes après suppression de la moitié des feuilles de la rosette ou ablation des inflorescences ou des siliques par rapport aux quantités d'azote total des plantes témoin (Figure V-2). Les résultats ont été obtenus au début de la floraison (6 Avril), au cours de la floraison (26 Avril), au début (10 Mai) et à la fin (26 Juin) du remplissage des siliques des plantes témoin. Chaque valeur indique la moyenne  $\pm$  S.E. pour n=3. NS = non significatif.

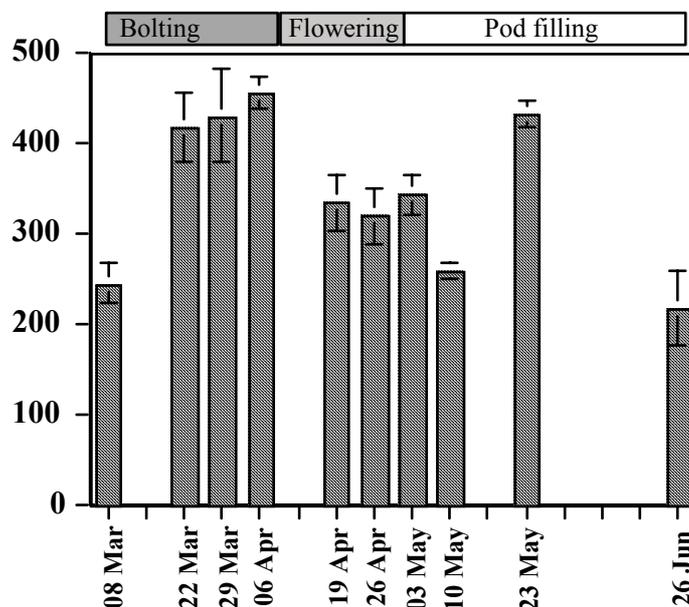
---

**Changes in total N amount (% variations  
between treated and control plants)**

---

	Leaf halving	Flower removal	Pod removal
<b>Beginning of flowering (6 April)</b>	NS	NS	-
<b>Flowering (26 April)</b>	NS	NS	-
<b>Beginning of pod filling (10 May)</b>	-25.7 $\pm$ 3.2	+20.1 $\pm$ 3.2	NS
<b>End of pod filling (26 June)</b>	-30.7 $\pm$ 6.2	-39.3 $\pm$ 6.9	-63.9 $\pm$ 2.7

---



**Figure V-3** : Total <sup>15</sup>N amount (µg <sup>15</sup>N.plant<sup>-1</sup>.7 days<sup>-1</sup>) following 7 days labelling in control plants during the growth cycle. Vertical bars indicate the mean ± S.E. for n=3.

**Figure V-3** : Quantité de <sup>15</sup>N total (µg <sup>15</sup>N.plant<sup>-1</sup>.7 days<sup>-1</sup>) après 7 jours de marquage chez les plantes témoin pendant le cycle de culture. Les barres verticales indiquent l'écart type de la moyenne pour n=3.

**Tableau V-II** : Percentage variations in total <sup>15</sup>N amount incorporated during 7 d in plants subjected to leaf halving or flower or pod removal as compared with <sup>15</sup>N amount incorporated during 7 days in control plants (Figure V-3). The results given were obtained during beginning of flowering (6 April), flowering (26 April), beginning (10 May) and end (26 June) of pod filling in control plants. Each value indicates the mean ± S.E. for n=3. NS = non significant.

**Tableau V-II** : Pourcentage de variations des quantités de <sup>15</sup>N total incorporés pendant 7 jours par les plantes après suppression de la moitié des feuilles de la rosette ou ablation des inflorescences ou des siliques par rapport aux quantités de <sup>15</sup>N total des plantes témoin (Figure V-3). Les résultats ont été obtenus au début de la floraison (6 Avril), au cours de la floraison (26 Avril), au début (10 Mai) et à la fin (26 Juin) du remplissage des siliques des plantes témoin. Chaque valeur indique la moyenne ± S.E. pour n=3. NS = non significatif.

---

**Changes in total <sup>15</sup>N amount (% variations  
between treated and control plants)**

---

	Leaf halving	Flower removal	Pod removal
<b>Beginning of flowering (6 April)</b>	NS	NS	-
<b>Flowering (26 April)</b>	+24.8 ± 8.9	+51.4 ± 7.2	-
<b>Beginning of pod filling (10 May)</b>	+39.9 ± 12.8	+42.8 ± 21.4	NS
<b>End of pod filling (26 June)</b>	NS	+164.4 ± 85	NS

---

flowering lasted longer for plants without pods (Figure V-1D: still 0.9 g.plant<sup>-1</sup> in late May), whereas the flowering stage was completely ended for control plants by mid-May.

### **III-B- Amount of total N in the whole plant**

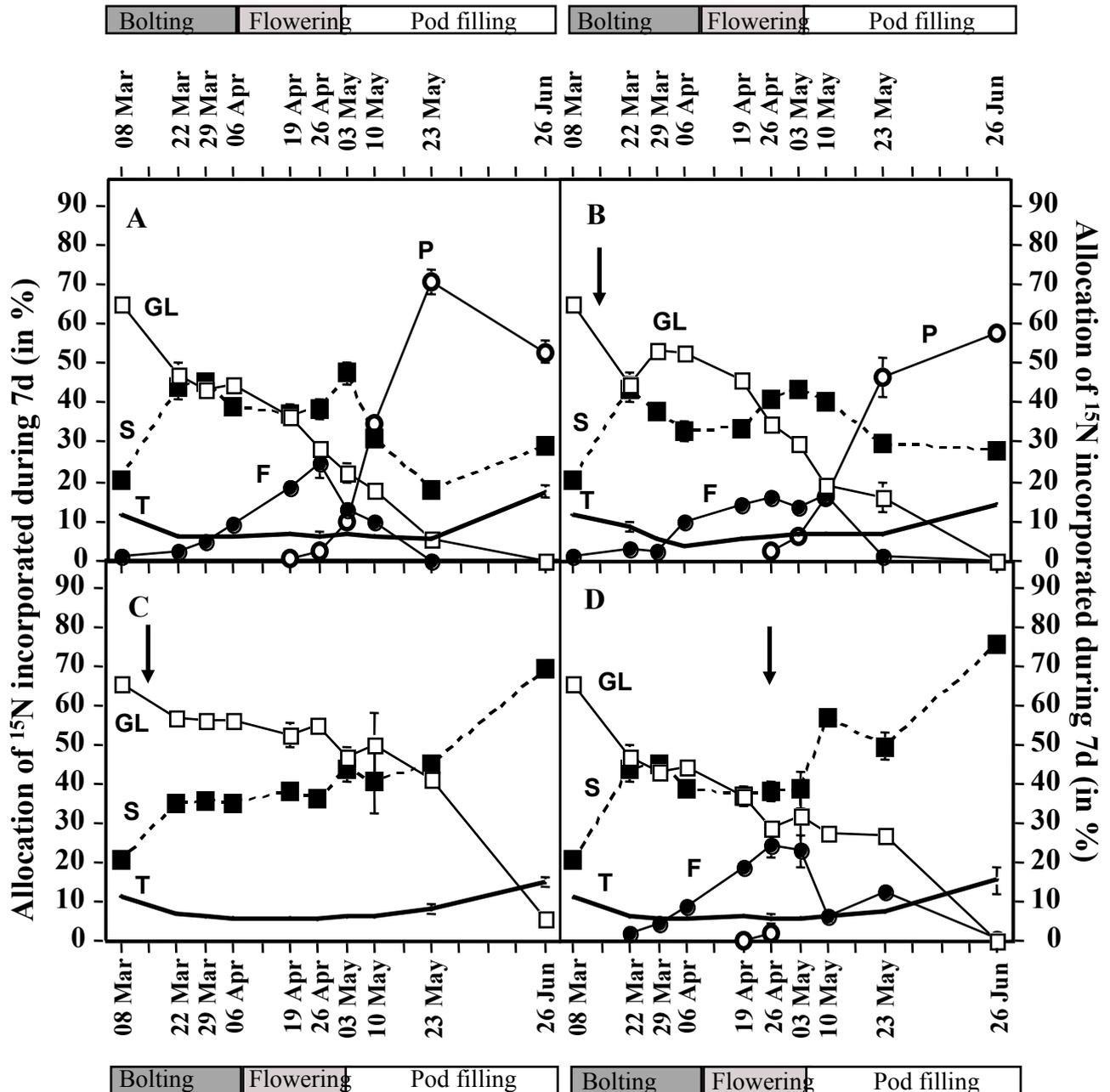
In order to focus on the consequences of source-sink changes on N amount, total N in the whole plant for control is shown in Figure V-2, while variations of total N (mg.plant<sup>-1</sup>) between treated and control plants are given in Table V-I. Total N of control plants (Figure V-2) remained steady (around 577 mg.plant<sup>-1</sup>) from the end of March until full flowering on 19 April. Then, it almost doubled and levelled off until late May supporting the biomass increase shown previously (Figure V-1) and it finally reached 1400 mg.plant<sup>-1</sup> at pod maturity stage (26 June ; figure V-2).

Total N amount remained unaffected by leaf halving or flower removal until the end of flowering of control plants (Table V-I). Thereafter, total N amount was reduced by 26 % in leaf halving plants. In deflowered plants, the aerial and root biomass increase led to a higher total N (+20 %) than in control plants. Finally, at the end of experiment, leaf halving, flower and pod removal led to significant declines in total N compared with control plants (31, 40 and 64 % lower respectively). This decrease is mainly due to senescence process and is also partly linked to the strong leaf drop occurring later than in control (during June ; figure V-1) and which has not been precisely quantified.

### **III-C- <sup>15</sup>N amount in the whole plant and allocation**

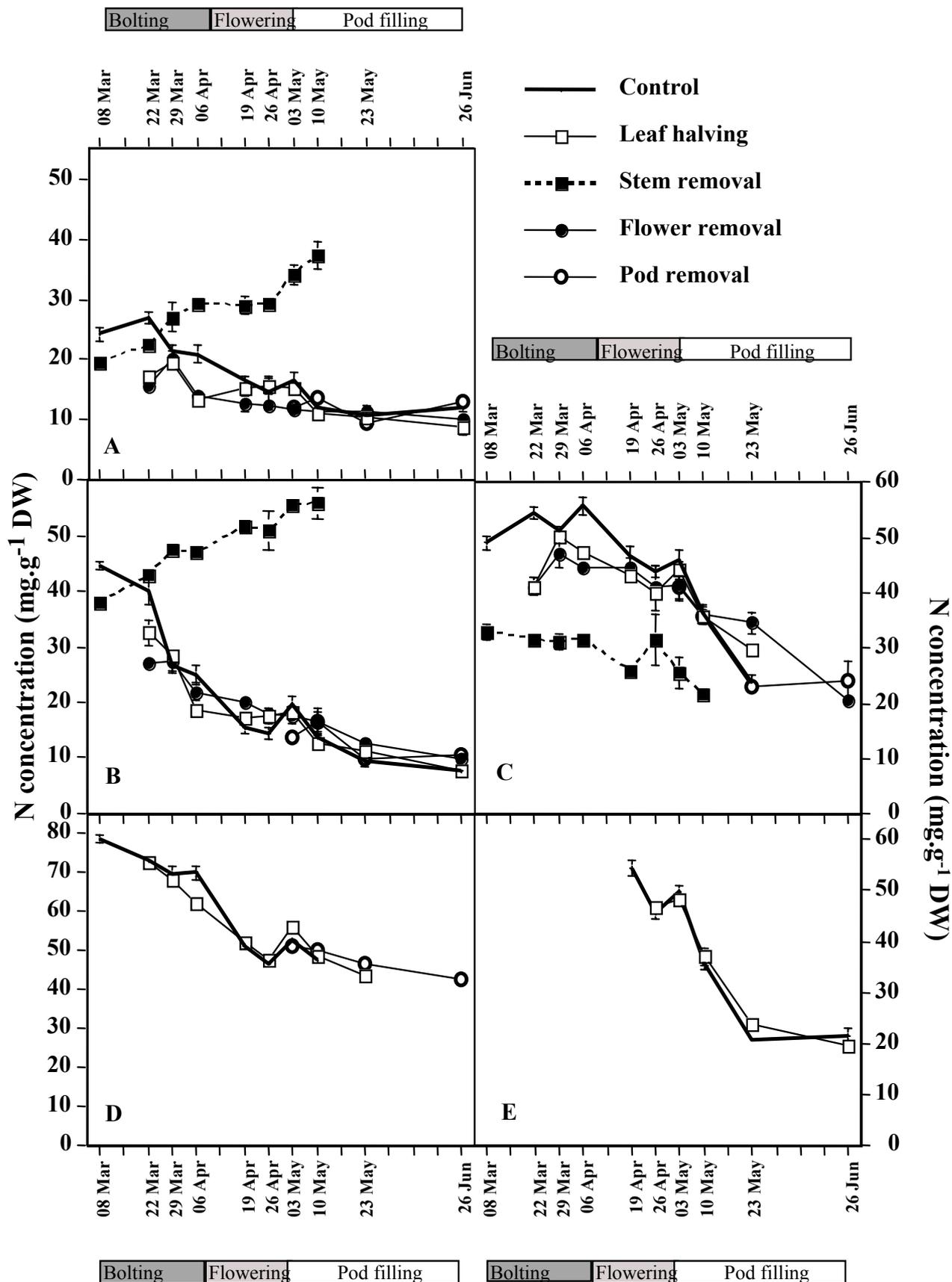
<sup>15</sup>N was applied 7 days before each harvest in order to study N uptake variations for a given date in relation to source-sink changes between treatments (Figure V-3 ; Table V-II). Total <sup>15</sup>N uptake in control plants showed no consistent pattern and ranged from 218 to 460 µg.plant<sup>-1</sup>.7 d<sup>-1</sup> (Figure V-3). Table V-II shows the uptake in treated plants as a percentage of that in control plants. Leaf halving induced higher uptake during flowering (+25 %) and during pod filling (+40 %) but was similar to control plants at the end of pod filling. In deflowered plants, N uptake rate was always higher than in control plants (Table V-II). Depodding had no significant effect on N uptake as compared with control plants.

Trends observed in the changes of allocation of <sup>15</sup>N taken up during 7 days were clearly related to pattern of the dry weight distribution for each treatment (Figure V-4). In addition, the weekly allocation of <sup>15</sup>N to each organ gives an indication of the sink strength of



**Figure V-4 :** Effects of leaf halving (B) or flower (C) or pod (D) removal as compared to control plants (A) on allocation of  $^{15}\text{N}$  incorporated during 7 days in taproot (T), stem (S), green leaves (GL), flowers (F) and pods (P) of *Brassica napus* L., expressed as % of total  $^{15}\text{N}$  incorporated by each plant. Arrows indicate the beginning of each treatment. Vertical bars, when large enough, indicate the mean  $\pm$  S.E. for n=3.

**Figure V-4 :** Effets de la suppression de la moitié des feuilles de la rosette (B) ou de l'ablation des inflorescences (C) ou des siliques (D) en comparaison aux plantes témoin (A) sur la répartition de  $^{15}\text{N}$  incorporé après 7 jours dans le pivot (T), la hampe (S), les feuilles vertes (GL), les inflorescences (F) et les siliques (P) chez *Brassica napus* L., exprimée en pourcentage de  $^{15}\text{N}$  total incorporé dans chaque plante. Les flèches indiquent le début de chaque traitement. Les barres verticales apparaissent lorsqu'elles sont suffisamment grandes et indiquent l'écart type de la moyenne pour n=3.



**Figure V-5** : Effects of leaf halving or stem, flower or pod removal on the N concentration in taproot (A), stem or remaining stem (B), green leaves (C), flowers (D) and pods (E) of *Brassica napus* L.. Vertical bars, when large enough, indicate the mean  $\pm$  S.E. for n=3.

**Figure V-5** : Effets de la suppression de la moitié des feuilles de la rosette ou de l'ablation de la hampe, des inflorescences ou des siliques sur la teneur en azote dans le pivot (A), la hampe ou le reste de la hampe (B), les feuilles vertes (C), les inflorescences (D) et les siliques (E) chez *Brassica napus* L.. Les barres verticales apparaissent lorsqu'elles sont suffisamment grandes et indiquent l'écart type de la moyenne pour n=3.

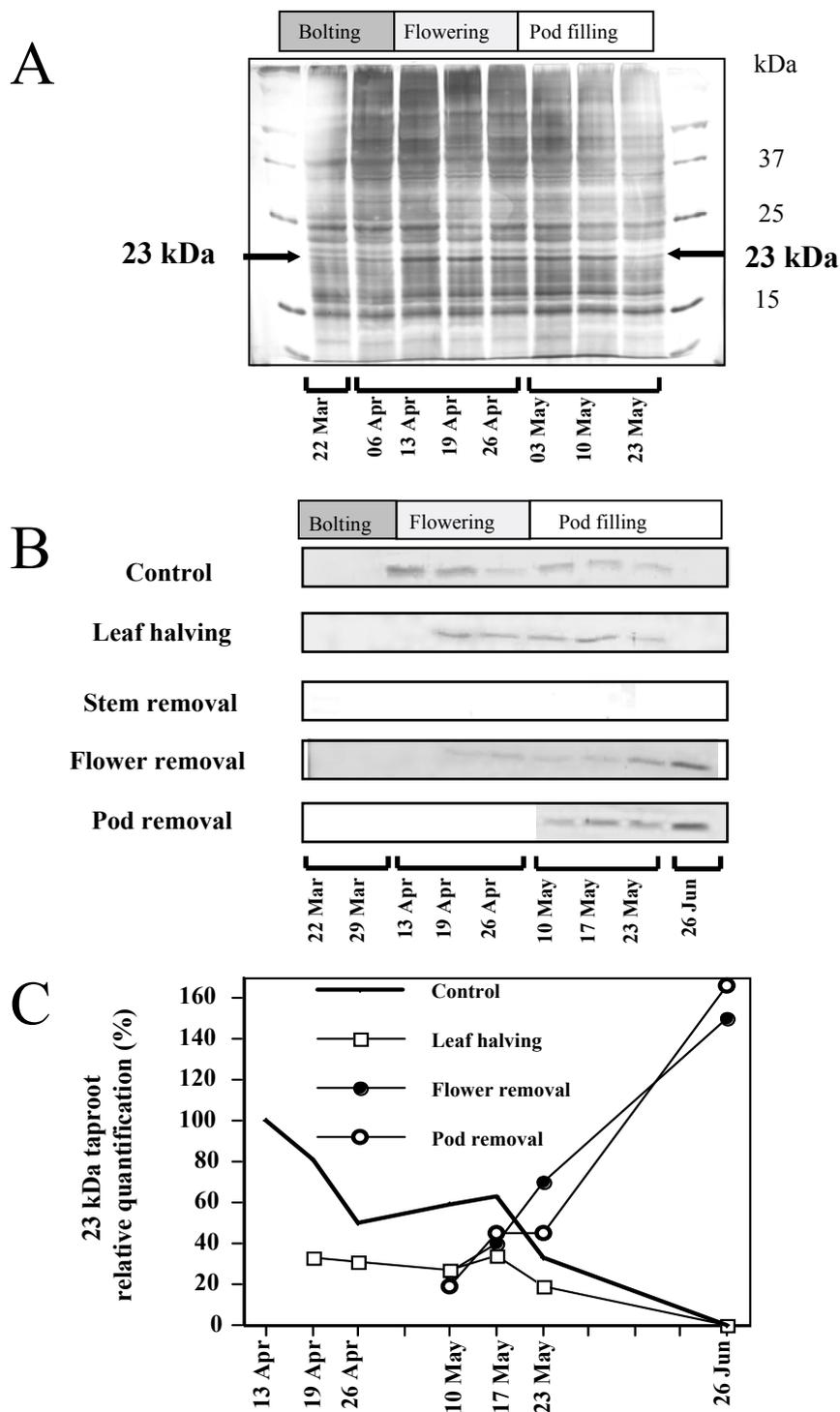
different tissues for N throughout development. In control plants (Figure V-4A), N taken up by vegetative tissues during bolting could be ranked in the following order: leaves > stem > taproot. During flowering,  $^{15}\text{N}$  allocation to flowers gradually increased to 25 % on 26 April (Figure V-4A) reflecting the shift in sink strength from leaves to reproductive organs. From 3 May onwards pods became the main sink, and  $^{15}\text{N}$  allocation increased rapidly to a peak of 71 % of total  $^{15}\text{N}$  on 23 May (Figure V-4A).

Leaf halving (Figure V-4B), induced a slower decrease of leaf sink strength such that more N was allocated to leaf during April and May than in controls. Consequently, less  $^{15}\text{N}$  was attributed to flowers even though  $^{15}\text{N}$  allocation towards flowers was maintained for longer: still 17 % on 10 May (Figure V-4B) versus only 10 % in control plants (Figure V-4A). In addition, the relative allocation of  $^{15}\text{N}$  to stem was maintained at a higher level throughout May. Finally, leaf halving did not alter taproot total  $^{15}\text{N}$  allocation throughout the whole experiment.

Reproductive tissue suppression (Figure V-4C, D) by removing the strongest sinks of control plants (Figure V-4A), also contributed to maintain high part of  $^{15}\text{N}$  allocated to leaves until the end of May while it increased the strength of stem for N taken up to represent the largest part to the total  $^{15}\text{N}$  (70-75 % of total  $^{15}\text{N}$  in late June ; figure V-4C, D versus 29 % in control plants ; figure V-4A). Thus, in deflowered plants, allocation to leaves was maintained at a higher level for longer (50% versus 18% in controls on 10 May ; figure V-4C).  $^{15}\text{N}$  allocation to stem was lower than controls in March and early April, but this gradually increased through May and June in contrast to controls. Pod removal (Figure V-4D) also had major effects: N allocation to stem was very high, and allocation to leaves and flowers continued for much longer than in controls (23 % on 3 May to flowers ; figure V-4D versus 12.5 % in control plants ; figure V-4A). N allocation to taproot was not significantly affected by flower or pod removal (Figure V-4C, D).

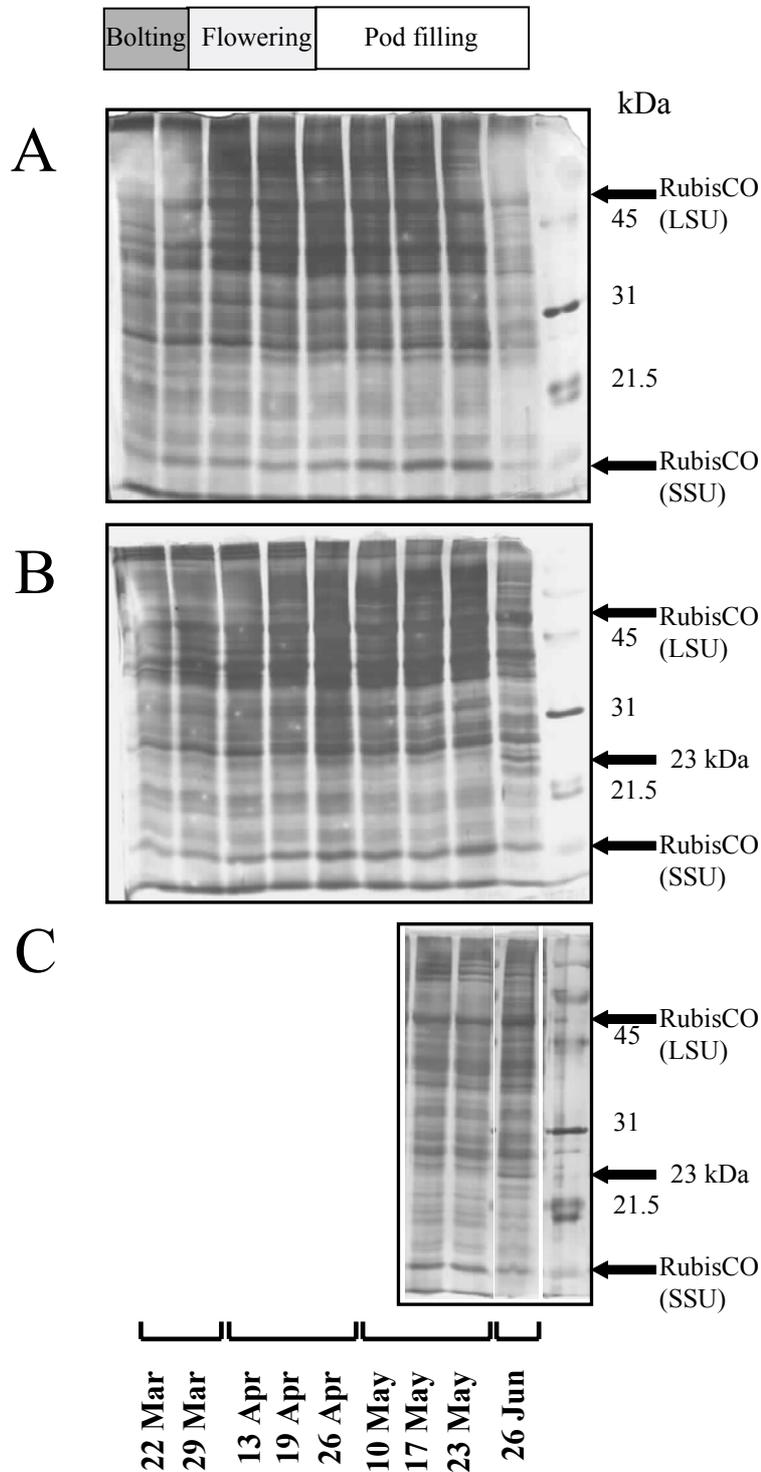
### **III-D- N concentration**

Stem removal was the only treatment leading to significant changes in N concentration in some plant parts (Figure V-5). From 29 March onwards, N concentration increased continuously in taproot of plants without stems (Figure V-5A), up to  $37 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$  versus  $12 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$  in control plants on 10 May. Stem removal treatment also led to a similar increase in N concentration of remaining stem (Figure V-5B). In contrast, leaf N concentration (Figure V-5C) remained low after stem removal in comparison with control



**Figure V-6 :** A- Changes in SDS-PAGE profiles of soluble proteins, extracted from taproots of *Brassica napus* L. control plants, grown in field conditions. Each well was loaded with a constant amount of soluble protein (3.4  $\mu\text{g}$  per lane) and the position of molecular weight markers is indicated on the right side. Arrows indicate VSP of 23 kDa. B- Effect of leaf halving or stem, flower or pod removal on accumulation of the 23 kDa VSP in taproot of *Brassica napus* L.. Immunodetection of the 23 kDa VSP was performed after separation by SDS-PAGE and western-blotting of the soluble proteins extracted from taproot. C- Relative quantification on blot of the 23 kDa VSP in taproot of *Brassica napus* L. following leaf halving or flower or pod removal. The 23 kDa VSP representation is given in % of maximum value for control plants taproot.

**Figure V-6 :** A- Evolution du profil électrophorétique (SDS-PAGE) des protéines solubles extraites du pivot de plantes témoin de *Brassica napus* L., cultivées en conditions de plein champ. Une quantité constante de protéines solubles a été déposée par puits (3,4  $\mu\text{g}$  par piste) et la position des marqueurs de poids moléculaires est indiquée sur la droite. La présence de la VSP de 23 kDa est indiquée par les flèches. B- Effet de la suppression de la moitié des feuilles de la rosette ou de l'ablation de la hampe, des inflorescences ou des siliques sur l'accumulation de la VSP de 23 kDa dans le pivot de *Brassica napus* L.. L'immunodétection de la VSP de 23 kDa a été réalisée après séparation par SDS-PAGE et western-blotting des protéines solubles extraites du pivot. C- Quantification relative sur blot de la VSP de 23 kDa dans le pivot de *Brassica napus* L. après suppression de la moitié des feuilles de la rosette ou ablation des inflorescences ou des siliques. La représentation de la VSP de 23 kDa est donnée en % de la valeur maximum obtenue pour des pivots de plantes témoins.



**Figure V-7** : Effect of flower (**B**) or pod removal (**C**) on the accumulation of the 23 kDa VSP in stem of *Brassica napus* L. as compared to control plants (**A**). For SDS-PAGE, each well was loaded with a constant amount of soluble protein (3.4 µg) and the position of molecular weight markers is indicated on the right side. Arrows indicate the proteins of interest. LSU: Large SubUnit of RubisCO (55 kDa); SSU: Small SubUnit of RubisCO (15 kDa).

**Figure V-7** : Effet de la suppression des inflorescences (**B**) ou des siliques (**C**) sur l'accumulation de la VSP de 23 kDa dans la hampe chez *Brassica napus* L. en comparaison à des plantes témoin (**A**). Pour la SDS-PAGE, une charge constante de protéines solubles est déposée (3,4 µg) et la position des marqueurs de poids moléculaires est indiquée sur la droite. La présence des protéines d'intérêt est indiquée par les flèches. LSU: grande sous-unité de la RubisCO (55 kDa) ; SSU: petite sous-unité de la RubisCO (15 kDa).

plants. However, while foliar N concentration in deflowered or leaf halving plants was lower than in control plants early in the vegetative development (in March and April ; figure V-5C), it was higher from 23 May onwards as compared with control plants. In addition, N concentration in leaves of deflowered and depodded plants remained significantly high until the end of June (Figure V-5C). (NB In control plants most leaves had been shed by 26 June)

### **III-E- 23 kDa VSP accumulation**

The accumulation of the 23 kDa VSP in the taproot of control plants (Figure V-6A, B, C) occurred in early April becoming the most prominent polypeptide on 13 April (flowering stage) and was fully remobilized during pod development in June. In leaf halving plants (Figure V-6B, C), as compared to control plants, the 23 kDa accumulation was lower and appeared later. On 19 April, VSP represented about one third of the maximum control value (Figure V-6C) ; levels remained steady until mid May before declining and disappearing by the end of June. In stem removal plants, there was no accumulation of VSP (Figure V-6B). In comparison with control plants, deflowered and depodded plants (Figure V-6B, C) showed a late and strong 23 kDa VSP accumulation (150 % and 166 % of the maximum control value respectively ; figure V-6C, in the end of June), without any apparent remobilization.

The storage of 23 kDa VSP in response to source or sink changes was also analysed by SDS-PAGE in stem (Figure V-7) and leaves (data not shown). No VSP was detectable in stem (Figure V-7A) or leaves (data not shown) of control plants. However, in deflowered (Figure V-7B) and in depodded plants (Figure V-7C), a low accumulation of 23 kDa VSP in stem (Figure V-7) and of an immunologically related 24 kDa protein in leaves (data not shown) occurred in late June. It was therefore concomitant with the strong accumulation of 23 kDa in taproots for both of these treatments (Figure V-6). The accumulation of 23 kDa is also observed in June in stems of depodded plants (Figure V-7). In all cases, VSP accumulation in taproots, and eventually in stems (Figure V-7) was concomitant with the remobilization of the two subunits of RubisCO, in stems (Figure V-7) and in leaves (data not shown).

## **IV- DISCUSSION**

In oilseed rape, N for grain filling mostly occurs through mobilization of N derived from vegetative tissues (Rossato *et al.*, 2001), and leaves, stems and pods walls each contribute about one third of the final seed N content in plants with high N application (Schjoerring *et al.*, 1995). In the work described here, interactions between organs through developmental stages were investigated in field conditions by studying the uptake, allocation and storage of N as VSP in plants with altered source-sink relationships. Thus, this work mainly focused on organs with respect to their N source or sink function.  $^{15}\text{N}$  labelling was used to evaluate changes in sink organs (i.e. with increased  $^{15}\text{N}$  allocation) following organ removal. Source (sink) strength of an organ with respect to a substance is described as the net rate at which it is transported out of (or stored within) that organ (Sadras *et al.*, 1993). Additionally, VSP are reported to be modulated by the relative activities of source and sink tissues (Mason and Mullet, 1990). Alterations in N source-sink relationships by removal of organs allowed us i) to estimate source capacity of leaves (i.e. potential assimilate supply to developing organs, Tollenaar, 1977) and ii) to disrupt sink capacity of stem, flowers and pods (i.e. their potential to accumulate assimilates, Tollenaar, 1977) in order to examine the consequences for N re-translocation and its potential storage as VSP in alternative sinks (i.e. vegetative organs) before remobilization towards pods.

Our study showed that while N uptake was generally lower from flowering onwards, growth and total N amount increased until the end of development. A 23 kDa protein previously characterized as a VSP was accumulated during flowering and was remobilized during grain filling. Such a pattern of accumulation/remobilization of the VSP has been shown in hydroponic conditions (Rossato *et al.*, 2001) and in field conditions (Rossato, 2000), in oilseed rape (cv Capitol).

Source limitation by leaf halving (i.e. decrease of source-sink ratio) induced a decrease in N total amount per plant (Table V-I). In the meantime, growth (Figure V-1), N uptake (Table V-II), and the relative allocation of N taken up towards leaves were maintained longer than in control plants (Figure V-4). This coincided with a delayed and minor 23 kDa VSP accumulation, it led to lower pod production (Figure V-1) and total N amount in pods of leaf halving plants (data not shown). This last result is consistent with the observations of Voltas *et al.* (1997) which demonstrated that N content in spikes of barley (*Hordeum vulgare* L.) was partially related to N stored in vegetative tissues at anthesis. In the leaf removal treatment,

despite rapid re-growth of leaves to control levels, plant development was delayed and N storage was lower. New growing shoots, thus, represented a stronger sink than taproot, and VSP accumulation consequently occurred to a lesser extent than in control plants (Figure V-6). Moreover, this would provide evidence that VSP accumulation would result from early senescing leaves before flowering when reproductive sinks are still weak. This result matches those obtained in woody plants. Thus, O'Kennedy and Titus (1979) described the importance of the mobilization of N compounds from leaves in the fall and their winter storage for re-use during spring growth to conserve nutrients which would otherwise be lost upon leaf abscission. However, using a VSP antisense construct to create transgenic plants in which VSP expression was suppressed in leaves, flowers and seed pods, Staswick *et al.* (2001) have recently demonstrated that VSP are not essential for maximal seed production or seed protein accumulation in soybean. In addition, VSP do not quantitatively represent the main stored N pool in peach trees but would play an important role in spring regrowth initiation since they constitute the first N reserve mobilized (Gomez and Faurobert, 2002). Our results show that final pod production decreased to about 30 % after leaf halving early in vegetative stage (Figure V-1). This suggests that a perturbation in photosynthesis and / or assimilate allocation in the mid-bolting stage had a significant effect on yield. Previous experiments involving source size variation by leaf removal, before and during flowering, have shown that assimilate supply was an important factor determining pod formation and seed set in oilseed rape (Tayo and Morgan, 1979 ; Rood *et al.*, 1984b ; Habekotté, 1993). In addition, Diepenbrock (2000) emphasised that dry matter (mainly of leaves) produced in early spring was important for later pod growth in oilseed rape by mobilizing the transiently stored substances.

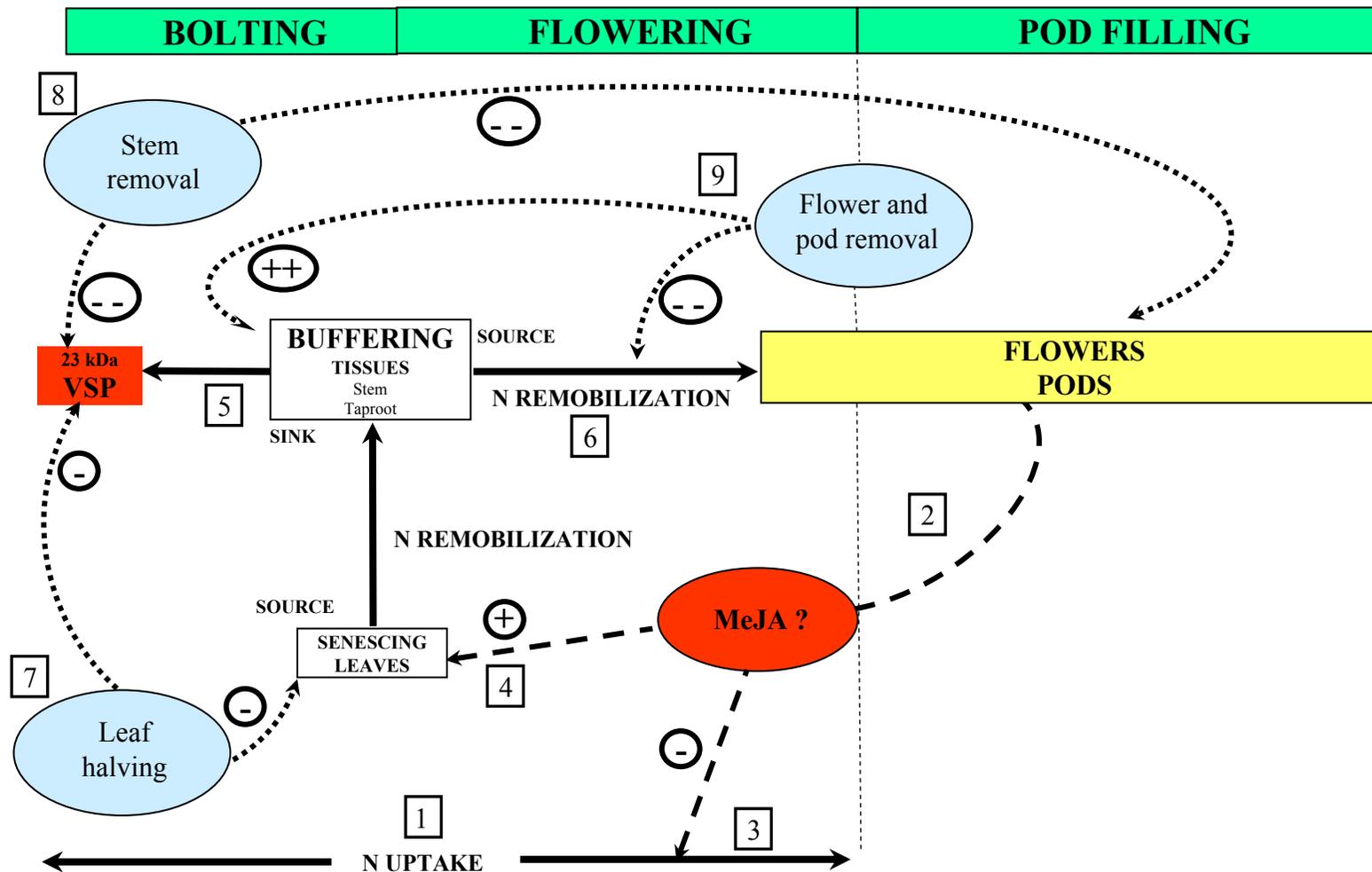
Increasing the source-sink ratio by flower removal or depodding induced an increase in leaf biomass (Figure V-1), which would suggest an increase in photosynthetic rate. In response to these treatments, N was initially used for new shoot development. N uptake was maintained in depodded plants and significantly enhanced in deflowered plants (Table V-II). There was a preferential allocation of  $^{15}\text{N}$  towards shoot (initially to leaves and later to stem) to sustain growth (Figure V-4). These results match those reported in previous studies in oilseed rape (Rood *et al.*, 1984a). These authors have already described increases in root, stem and leaf growth after pod removal. The distribution of N compounds into each organ is strictly controlled by the sink capacity (Osaki *et al.*, 1995). Indeed, the removal of the developing sink tissues led to an over-accumulation of the VSP in soybean mature leaves, which then act as a sink storage organ (Wittenbach, 1983 ; Staswick, 1989 ; Tranbarger *et al.*, 1991). Our results suggest that continuous removal of flowers or pods delayed the onset of

foliar senescence (Figure V-1) and the mobilization of leaf N compounds in oilseed rape. This is consistent with the findings of Wittenbach (1982) and Buchanan-Wollaston (1997). Noodén *et al.* (1997) have also reported that male sterility inhibits monocarpic senescence in soybean by blocking pod development. Moreover, the delayed senescence by excision of flowers suggests that relationships between reproductive and vegetative development may have a crucial role in the onset of senescence (Pic *et al.*, 2002).

When growth has stopped and senescence was activated in plants for which the major reproductive sink tissues were suppressed, the new taken up N was preferentially allocated to taproot and stem (Figure V-4) and the same pattern was observed for total N allocation (data not shown). VSP accumulation in taproot was delayed and showed no remobilization in deflowered plants and in depodded plants. Thus, the highest levels were noted at the end of June, at which time VSP also appeared in stem (Figure V-6) while hydrolysis of the two subunits of RubisCO was promoted (Figure V-7). This would suggest that temporary storage of N could be related to N mobilization from shoot, especially leaves. In agreement with Gomez and Faurobert (2002) in *Prunus persica*, our data show that VSP accumulation could result from strong synthesis as a result of the availability of high concentrations of the basal constituents and/or to lack of use of N compounds (amino acids, proteins) in the absence of sinks.

VSP also accumulates in soybean, albeit transiently, during the course of normal senescence (Salvucci *et al.*, 1995). Thus, VSP expression following seed maturation of soybean is due to high quantities of leaf amino acids after proteolysis and because of the absence of growing tissues to which they could be exported (Staswick, 1990). VSP may be part of the normal metabolic machinery of protein degradation and remobilization during senescence (Mira *et al.*, 2002). Moreover, our results suggest that the 23 kDa VSP synthesis would be linked to N remobilized from leaves. Indeed, its accumulation occurred parallel to a decrease in N uptake and in N allocation towards leaves and was prevented as long as shoot growth was maintained. These observations match those of previous studies on poplar where BSP accumulation is obviously consecutive to transport of N compounds from the aging leaves in autumn (Coleman *et al.*, 1993). In addition, this correlation in poplar is emphasized by the effect of environmental impacts (such as a fungal attack or mechanical injury) which enhance yellowing of leaves and also affect protein deposition (Sauter and Van Cleve, 1991).

Among different factors known to modify N source-sink relationships within the plant and to regulate VSP expression, methyl-jasmonate (MeJA) which strongly reduced N uptake in oilseed rape also increased VSP accumulation (Rossato *et al.*, 2002a, b) with similarities to



**Figure V-8 :** Proposed scheme for controlled events cascade of N cycling during the growth cycle in *Brassica napus* L.. Solid lines represent utilization of N coming from remobilization or uptake and dashed lines indicate regulation of N cycling for plants with normal ontogenic cycle (---) or plants submitted to alterations of source-sink relationships (...).

**Figure V-8 :** Schéma hypothétique pour la succession d'évènements contrôlés du recyclage d'azote au cours du cycle de culture chez *Brassica napus* L.. Les flèches continues symbolisent l'utilisation de l'azote provenant de la remobilisation ou de l'absorption et les flèches en pointillés indiquent les régulations du recyclage d'azote chez les plantes à cycle ontogénétique normal (---) ou chez les plantes soumises à un bouleversement des relations source-puits (...).

physiological process found in plant in natural conditions during flowering and pod filling. In addition, the percentage of 23 kDa VSP accumulation in taproot is correlated with N amount remobilized from leaves for oilseed rape at the vegetative stage treated with MeJA during 10 days (L Rossato, pers. comm.). JA is generally most abundant in young developing organs (Staswick, 1992). Yet, stem removal during bolting of oilseed rape increased taproot development but prevented VSP accumulation (Figure V-6) although N concentration of taproot and remaining stem increased (Figure V-5). However, when stem is removed later in the growth cycle, VSP accumulation can occur (data not shown). Consequently, this could indicate that a specific signal such as MeJA, acting in leaf senescence, could actually be synthesized in buds and flowers during elongation of stem, which is parallel to development of young reproductive organs. Nitrogen in excess for VSP synthesis could then be supplied from senescing leaves. Even though the occurrence of MeJA in rape need to be clearly demonstrated, this hypothesis is reinforced by convincing evidence of volatilization of compounds probably derived from the MeJA biosynthetic pathway in an oilseed rape culture (Mc Ewan and Macfarlane Smith, 1998).

We propose the following scheme (Figure V-8) to summarize N source-sink relationships and further N cycling during the growth cycle in oilseed rape. Steps 1 to 6 describe normal ontogenic cycle. (1) Vegetative growth during bolting occurs through N uptake supply. (2) Development of buds and flowers, MeJA synthesis in young organs could indicate a break point in stem developmental program concomitant with full flowering. (3) MeJA may decrease N uptake. (4) Massive leaf senescence is induced by MeJA and subsequent N remobilization occurs in senescing source leaves. (5) Accumulation of 23 kDa VSP in taproot and stem indicates N cycling from senescing leaves to vegetative tissues for storage, resulting from a gap between massive source N availability and low N demand of reproductive sinks. (6) Sink to source transition of taproot and stem is indicated by the 23 kDa VSP remobilization. Vegetative tissues N remobilization sustains pod development and seed filling. Steps 7 to 9 result from organs removal. (7) After leaf halving, less N is remobilized from senescing leaves. 23 kDa VSP taproot accumulation is reduced following delay in flowering and seed yield is decreased. (8) Bud development, putative MeJA transduction signal and further 23 kDa VSP taproot accumulation are inhibited by early stem removal. (9) Removal of reproductive organs (such as flowers and pods) delays and increases 23 kDa accumulation in taproot after vegetative growth resumption whereas N remobilization becomes useless.

Rood *et al.* (1984b) postulated that there was a relationship between senescence of leaf, pod and stem tissue of oilseed rape with the cessation of N uptake and suggested that prevention of leaf senescence when N uptake continue could increase yields. Habekotté (1993) suggested improvement of the utilization of pre-flowering assimilates by enhancing accumulation of reserves before flowering and increase of the efficiency of translocation during seed filling may result in higher final seed weight. It would, therefore, be interesting to balance the dislocation between leaf senescence and later pod filling by a higher transient N storage in vegetative tissues in order to increase following remobilization to seeds. Thus, whereas developmental and hormonal factors determine the relative N sink strength of organs, our results suggest that the deposition of VSP in storage buffer tissues like taproot and stem may contribute to salvage the N resources of oilseed rape when development of reproductive organs is limited or delayed. Consequently, VSP could act as a source-sink N storage buffer.

### **Acknowledgments**

The authors wish to thank Dr Philippe Laîné, Philippe Malagoli, Miss Michèle Coustenoble, Miss Christelle Le Dantec (UMR INRA/UCBN 950, Physiologie et Biochimie végétales, Université de CAEN) and spring students for help in sample acquisition. The authors also thank Dr Tony Gordon (IGER, Aberystwyth) and Dr Erwan Le Deunff (UMR INRA/UCBN 950), for valuable comments on this work.

***CHAPITRE VI : SYNTHÈSE DES RESULTATS ET  
DISCUSSION***

---

---

## **CHAPITRE VI :**

### **SYNTHESE DES RESULTATS ET DISCUSSION**

---

Ce travail de thèse s'intègre dans l'axe de recherche de l'UMR INRA-UCBN 950 EVA de CAEN, centré sur l'écophysiologie des espèces végétales cultivées.

L'approche envisagée par l'UMR participe au développement des connaissances sur le métabolisme des plantes en lien avec leur réponse aux contraintes environnementales en vue notamment d'améliorer le prélèvement et le stockage des nutriments. Avec de tels objectifs, les études menées visent à mieux appréhender les mécanismes qui contrôlent la dynamique de croissance (repousse après défoliation ou élaboration des tissus reproducteurs) et notamment la répartition des assimilats entre les différents organes. Par ailleurs, elles s'attachent à identifier et caractériser les fonctions physiologiques clés (acquisition, stockage et mobilisation des réserves N et C), tout en cherchant à mettre en évidence les régulations potentielles ainsi que l'effet de certains facteurs environnementaux.

Parmi les thèmes de recherche abordés par l'unité, l'un concerne la nutrition azotée et plus précisément l'étude de la régulation du prélèvement de l'azote et de l'efficacité de son utilisation par les espèces fourragères, notamment la luzerne et les plantes de grande culture telles que le colza.

La disponibilité du sol en azote constitue en effet l'un des principaux facteurs contrôlant la productivité. Les plantes supérieures ont par conséquent développé des stratégies permettant une meilleure valorisation de cet élément pour la croissance et le développement après son prélèvement par absorption racinaire ou fixation atmosphérique (Ourry *et al.*, 2001). La gestion de l'azote aussi bien dans le temps que dans l'espace dépend donc de son entrée et de sa répartition au sein de la plante tout au long de son cycle de vie, lesquels sont sous l'influence de facteurs ontogénétiques et environnementaux.

A l'échelle de la plante entière, les transferts d'azote concernent à la fois l'azote nouvellement acquis et alloué aux organes "puits" pour la croissance et l'azote stocké et recyclé à partir des organes sénescents et des tissus de réserve. Dans ce cadre, le rôle de l'azote mis en réserve et l'incidence de sa remobilisation sont particulièrement étudiés depuis plusieurs années au sein du laboratoire. Le recyclage d'azote au sein de la plante permet l'utilisation à plusieurs reprises de cet élément par différents tissus et à diverses étapes du développement (Ourry *et al.*, 2001). Ce processus de recyclage/accumulation constitue un moyen de conserver les ressources azotées et présente un intérêt évident en particulier lors de phases où la fourniture d'azote du sol et/ou les

voies d'acquisition et de réduction de l'azote ne sont pas suffisantes pour satisfaire les besoins liés à la croissance.

L'acquisition de données physiologiques et moléculaires propres à la gestion de l'azote présente ainsi un intérêt d'un point de vue fondamental. En effet, l'étude des différentes composantes du métabolisme azoté (prélèvement, stockage et mobilisation des réserves azotées) agissant seules ou en interaction doit permettre une avancée dans la compréhension des mécanismes de régulation du métabolisme azoté au niveau de la plante entière. De plus, elle peut également à moyen terme, permettre d'identifier des indicateurs de fonctionnement qui pourraient contribuer à l'amélioration des pratiques culturales (meilleure gestion de la fertilisation : dates d'apport, quantité...), ou encore présenter un intérêt pour la sélection végétale.

Ainsi, l'importance du stockage temporaire de l'azote, de sa mobilisation et des modifications de sa distribution au cours de périodes critiques de développement a notamment été démontrée grâce à des travaux se rapportant à la caractérisation de protéines ayant une fonction de réserve (Vegetative Storage Protein, VSP) (Staswick, 1994 ; Volenec *et al.*, 1996 ; Ourry *et al.*, 2001). D'abord décrites chez le soja, pour lesquelles ces protéines sont localisées essentiellement au sein des parties aériennes (Wittenbach, 1983 ; Staswick, 1988), de nombreuses VSP ont ensuite été mises en évidence dans les organes pérennes de différentes espèces herbacées ou chez les légumineuses fourragères (cf revue de Bewley, 2002) mais également dans les racines et les troncs des espèces ligneuses (Stepien *et al.*, 1994 ; Rowland et Arora, 1997). Leur accumulation se produit lorsque la quantité d'azote disponible est supérieure aux besoins pour la formation de nouveaux tissus et ce pool mis en réserve peut ensuite être mobilisé lors de périodes où la croissance végétative et/ou le développement de tissus reproducteurs sont intenses et alors que la fourniture d'azote par le milieu est insuffisante ou limitée.

**Dès lors, l'objectif général de ce travail de thèse était de déterminer les effecteurs capables d'influencer le processus de mise en réserve d'azote chez 2 espèces : la luzerne (plante pérenne) et le colza d'hiver (plante bisannuelle). L'étude des facteurs qui interviennent plus particulièrement dans la régulation de la synthèse de VSP devait alors permettre de préciser le rôle et l'importance de ces protéines spécifiquement impliquées dans le processus de stockage d'azote.**

Les principales conclusions de ce travail seront restituées au cours de ce chapitre et confrontées aux connaissances rapportées à ce jour sur le sujet. Une synthèse des données acquises au cours de cette thèse concernant la régulation de la synthèse des VSP chez la luzerne sera tout d'abord présentée. Je tiens ici à préciser qu'une grande partie de l'étude menée sur les VSP de la luzerne n'aurait pu être réalisée sans l'étroite collaboration qui existe depuis 10 ans entre l'UMR INRA-UCBN 950 EVA et l'équipe du Professeur J.J. Volenec du Département d'Agronomie de

l'Université de Purdue (Indiana, USA). Enfin, un bilan des mécanismes qui régissent les relations entre organes source et organes puits pour l'azote en lien avec l'accumulation de la VSP chez le colza au cours d'un cycle de culture suivi au champ, sera proposé.

## **I- REGULATION DE L'ACCUMULATION DES VSP CHEZ LA LUZERNE**

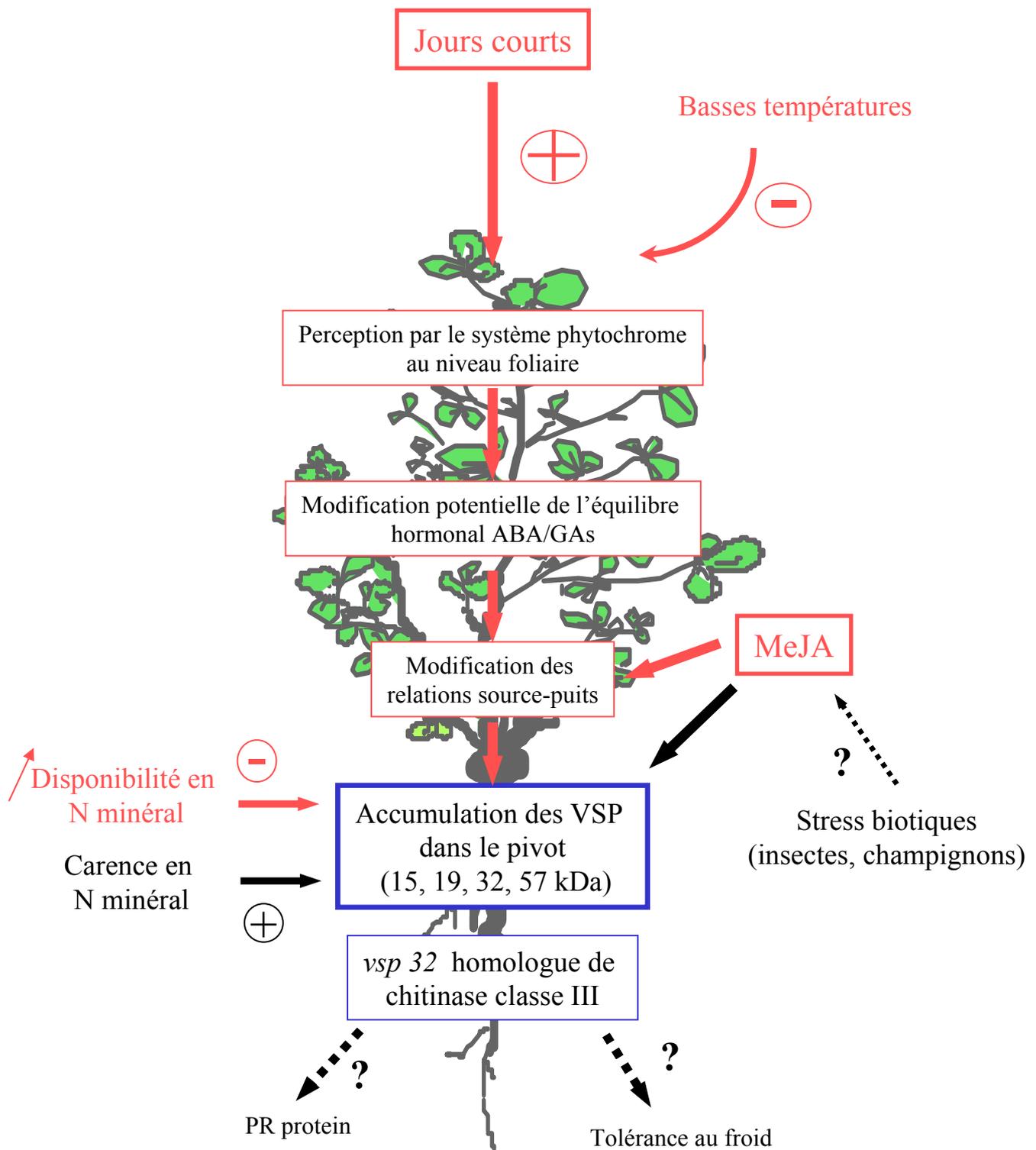
Chez la luzerne, plante pérenne, 4 VSP (15, 19, 32 et 57 kDa) sont accumulées dans le pivot, principalement à l'automne et remobilisées pour la reprise de croissance au printemps (Hendershot et Volenec, 1993a ; Gana *et al.*, 1998). Ces VSP contribuent également à la fourniture d'azote pour la repousse après une défoliation alors que l'absorption et la fixation d'azote sont fortement réduites (Hendershot et Volenec 1993b ; Avice *et al.*, 1996b). Plusieurs études réalisées en conditions contrôlées ou au champ ont montré que la teneur en VSP est corrélée au potentiel de repousse (Avice *et al.*, 1997b ; Justes *et al.*, 2002 ; Dhont *et al.*, 2002).

Dans un premier temps, notre étude visait à identifier les effecteurs d'origine environnementale ou endogène capables d'induire directement ou indirectement l'accumulation de VSP chez la luzerne.

Tout d'abord, il s'agissait de savoir si chez la luzerne -espèce pérenne adaptée à des conditions de faible disponibilité en azote- une augmentation du niveau d'azote minéral du milieu et conduisant à un excès par rapport à la demande pour la croissance, pouvait se traduire par une plus grande mise en réserve en particulier sous forme de VSP. C'est en effet le cas chez certaines autres espèces telles que le soja (Staswick *et al.*, 1991) ou le peuplier (Van Cleve et Apel, 1993) où l'accumulation des VSP augmente d'autant plus que la disponibilité en azote minéral est grande (cf Chapitre I, § III-C-2).

Par ailleurs, l'augmentation des teneurs en VSP au cours de la phase automno-hivernale permet de supposer qu'une diminution de l'héméropériode et/ou de la température puisse favoriser l'accumulation de ces protéines. Ces deux facteurs ont donc également fait l'objet de notre étude. Ces résultats nous ont ensuite menés à une étude plus approfondie de l'effet des jours courts en comparant leur incidence sur l'induction des VSP en cinétique chez deux variétés de luzerne différant par leur dynamique de repousse (Europe et Lodi). Nous nous sommes également attachés à comprendre par quel mécanisme une réduction de l'éclairement journalier intervenait en étudiant l'implication potentielle du système phytochrome.

Enfin, après avoir étudié les facteurs exogènes capables de moduler l'accumulation des VSP, notre étude a porté sur différents signaux endogènes pouvant relayer l'effet de ces paramètres environnementaux au sein de la plante. En effet, la modification des équilibres hormonaux instaurés entre différentes phytohormones pourrait avoir un rôle dans la mise en place des bouleversements des relations entre organes puits et organe source pour l'azote au sein de la plante et par voie de



**Figure VI-1** : Schéma hypothétique des facteurs environnementaux et des molécules signal intervenant dans l'induction de la synthèse des VSP du pivot de luzerne.

conséquence, moduler le niveau d'accumulation des VSP. Ainsi, les jasmonates et en particulier le MeJA, dérivé méthylé de l'acide jasmonique sont impliqués dans la réponse des plantes à de nombreux signaux environnementaux (la blessure, l'attaque de pathogènes) ou liés au développement (la sénescence, la tubérisation, la floraison ou la maturation) (Creelman et Mullet, 1997 ; Koda, 1997). L'intervention du MeJA en tant que signal inducteur de l'accumulation des VSP a été clairement démontrée chez plusieurs espèces. C'est pourquoi son rôle éventuel a également été testé chez la luzerne.

Ces différents facteurs environnementaux et hormonaux ont été étudiés d'un point de vue biochimique (notamment par l'utilisation d'un marquage continu à l'azote 15 et le dosage de VSP par ELISA) et au niveau moléculaire grâce à deux sondes ADNc correspondant aux VSP de 32 et 57 kDa (Noquet *et al.*, 2001 ; 2003). Le schéma de la figure VI-1 présentée dans ce chapitre tente de synthétiser l'état des connaissances sur les signaux potentiellement impliqués dans la régulation du niveau d'accumulation des VSP chez la luzerne et leurs mécanismes de transduction.

### **I-A- Alimentation azotée**

Même s'il semble bien établi que l'acquisition, la répartition et le stockage d'azote au sein de la plante dépendent de la disponibilité des ressources, nos résultats montrent que **l'augmentation de la nutrition azotée (de 1 à 5 mM de KNO<sub>3</sub> apportés dans la solution nutritive) chez la luzerne est sans incidence sur la répartition de l'azote entre organes (Figure III-2)**. Elle ne fait pas varier la teneur en protéines solubles totales du pivot (Figure III-3) et elle est **sans effet sur l'accumulation de VSP** dans cet organe (Figures III-4 et III-5). De même, Rossato *et al.* (2002a) ont montré qu'un accroissement de la disponibilité en azote (de 1 à 50 mM de KNO<sub>3</sub>) ne conduit pas à l'accumulation de l'azote sous forme protéique chez le colza : en effet, la synthèse de la VSP de 23 kDa n'est pas stimulée ; contrairement à ce qui a pu être observé chez d'autres espèces telles que le peuplier (Van Cleve et Apel, 1993 ; Coleman *et al.*, 1994) ou le soja (Staswick *et al.*, 1991).

Ainsi, chez le soja, alors que le niveau de transcrits des VSP des feuilles est très faible en cas de déficience azotée, de fortes concentrations en NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> conduisent à leur accumulation (Staswick *et al.*, 1991). L'augmentation de la mise en réserve d'azote sous forme de protéines pourrait donc constituer un moyen d'éviter que l'accumulation de cet élément sous forme soluble atteigne des niveaux toxiques pour la plante. Les VSP remplissent ainsi leur fonction de stockage de l'azote excédentaire. Par ailleurs, le déclin du niveau de transcrits observé normalement dans les feuilles matures se trouve retardé en présence de concentrations élevées en azote dans la solution nutritive. Dans ce cas, l'azote minéral étant fourni en abondance, la plante n'a pas besoin de recourir à l'azote de réserve des organes matures dont le stockage est alors maintenu. Ces données permettent de conclure que l'augmentation de la teneur en VSP chez le soja est donc liée à l'effet indirect de la disponibilité en azote *via* les changements de relations entre organes source et puits (Staswick,

1994). Cet effet indirect est confirmé par le fait que différentes formes d'azote minéral et organique appliquées sur des cultures cellulaires de soja sont sans effet sur le niveau de transcrits des VSP (Staswick *et al.*, 1991).

La différence de réponse face à une augmentation de la nutrition azotée entre différentes espèces pourrait s'expliquer par la localisation tissulaire spécifique des VSP (au niveau foliaire chez le soja et racinaire chez la luzerne ou le colza), les feuilles constitueraient un puits prioritaire pour l'azote comparativement aux organes racinaires. En effet, l'azote minéral est préférentiellement utilisé pour l'élaboration des tissus photosynthétiques. Nos résultats ainsi que ceux obtenus au cours d'une autre expérimentation (où l'apport de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  était augmenté de 1 à 20 mM pendant 21 jours ; Avice *et al.*, 2001a) montrent **que chez la luzerne, l'azote apporté en excès serait ainsi utilisé pour la croissance** de la plante puisqu'il en résulte une forte production de matière sèche totale (elle est doublée après 35 jours de traitement à 5 mM de  $\text{KNO}_3$  par rapport aux plantes témoin à 1 mM de  $\text{KNO}_3$  ; Figure III-1). **Cette utilisation pour la croissance essentiellement aérienne se fait donc au détriment d'une mise en réserve de l'azote au niveau racinaire.** Kalengamaliro *et al.* (1997) ont également rapporté qu'un accroissement de la fertilisation azotée chez des plantules de luzerne provoque une augmentation de la croissance mais ne conduit pas à une accumulation plus précoce de VSP.

L'effet d'une fertilisation azotée sur la quantité de VSP a également été analysée au champ (Justes *et al.*, 2002). Ces auteurs ont montré qu'un apport de  $100 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$  lors du semis ne conduit pas à une augmentation des teneurs en protéines solubles ou en VSP observées en fin d'hiver. La croissance aérienne de ces plantes fertilisées n'est pas augmentée au printemps suivant, comparativement aux plantes cultivées sans apport minéral azoté, et dépend alors presque exclusivement de la fixation symbiotique.

L'étude de l'impact du niveau de l'apport azoté a également été réalisée chez la chicorée. Ainsi, chez cette espèce, l'azote préalablement absorbé est fortement remobilisé vers les tubercules des plantes cultivées en conditions limitantes pour l'azote pendant la sénescence alors que le phénomène est plus progressif au cours de la période végétative pour des plantes correctement alimentées (Améziane *et al.*, 1997). La fourniture de nitrate à différentes concentrations modifie donc la dynamique de stockage avec une mise en réserve plus tardive en cas de privation d'azote ; cependant, le contenu final en VSP est comparable entre les plantes carencées ou bien alimentées en azote (Améziane *et al.*, 1997).

Dès lors, ces observations conduisent à s'interroger sur l'effet d'une limitation de la nutrition azotée chez la luzerne. Ourry *et al.* (1994) ont étudié l'effet d'un abaissement de l'alimentation azotée de 1 à 0,2 mM en  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Il engendre une diminution de la croissance aérienne de la luzerne après 15 jours de traitement mais ces travaux ne précisent pas l'impact de cette carence sur

la répartition des différents pools de réserves azotées au sein du pivot. De plus, de récentes études réalisées chez cette espèce ont mis en évidence une allocation préférentielle d'azote vers les organes racinaires en réponse à la carence azotée (Meuriot *et al.*, 2003a). Ceci s'accompagne d'une augmentation significative et progressive des teneurs en protéines solubles et VSP du pivot en fonction de la sévérité de la carence alors que la quantité d'azote absorbé est fortement limitée. Le stockage d'azote sous forme protéique semble sous le contrôle du statut source-puits et des besoins en azote des racines. En effet, la carence azotée réduit le rapport biomasse aérienne/biomasse racinaire en faveur d'une augmentation de la biomasse des racines et des pivots, ce qui suggère par ailleurs que la plante est capable de développer sa croissance racinaire, autorisant de ce fait une meilleure prospection racinaire quand le milieu est appauvri en azote minéral (Meuriot *et al.*, 2003a). Une faible disponibilité en azote, en induisant une augmentation de la taille du pivot, conduirait à l'augmentation des stocks d'azote, il en résulterait une plus grande stimulation de la synthèse des VSP (Meuriot *et al.*, 2003a).

**Ainsi, la luzerne est capable de constituer des réserves (principalement sous forme de VSP) dans des conditions de carence en azote alors qu'au contraire, une forte disponibilité en azote ne conduit pas à une augmentation de l'accumulation des réserves azotées sous forme de protéines dans le pivot de luzerne (Figure VI-1) mais se traduit par un accroissement des teneurs en azote et en acides aminés dans cet organe (Meuriot *et al.*, 2003a). Cette espèce adaptée à des environnements pauvres en azote peut donc ajuster son niveau de réserve azoté en fonction de la disponibilité de cet élément dans le milieu.**

La croissance de la luzerne au printemps ou après une défoliation étant corrélée avec les teneurs en protéines solubles du pivot (Volenc *et al.*, 1996 ; Justes *et al.*, 2002) ; cette réponse adaptative aux conditions de faible disponibilité en azote présente un intérêt pour un stockage pendant les périodes de dormance dans l'attente de conditions plus favorables pour la reprise de végétation (Meuriot *et al.*, 2003a).

### **I-B- Abaissement de la température**

**Nos travaux ont montré que l'application de basses températures (5°C) favorise le développement de l'appareil racinaire au détriment des organes aériens (Figure III-1). Ceci s'accompagne d'une allocation privilégiée de l'azote absorbé vers le compartiment racinaire (pivot et racines latérales ; Figure III-2).**

Contrairement au peuplier (Van Cleve et Apel, 1993), cette allocation préférentielle de l'azote vers les racines en réponse à **un abaissement de la température** (Chapitre I, § III-C-1) **ne conduit pas, chez la luzerne, à la mise en réserve d'azote sous forme de VSP** (Figures III-4 et III-5), même si les teneurs en protéines solubles totales sont plus élevées à 5°C (Figure III-3). Cette

absence d'effet se manifeste à la fois au niveau transcriptionnel (Figure III-6) et sur l'accumulation des VSP et ce, quelle que soit la longueur du jour (8h ou 16h). D'autre part, ceci est confirmé par de récentes observations faites sur des luzernes exposées à de basses températures en serre non chauffée pendant 12 ou 20 semaines : les niveaux de transcrits de la VSP de 32 kDa chutent alors par rapport à ceux de plantes non acclimatées et cultivées à 22°C (Dhont *et al.*, résultats non publiés).

En revanche, chez le trèfle, Bouchart *et al.* (1998) et Goulas *et al.* (2001) ont montré que le taux d'accumulation de la VSP de 17,3 kDa dans les stolons est négativement corrélé à la moyenne des températures minimales enregistrées au cours de deux hivers successifs, suggérant une induction de la synthèse de cette protéine en réponse aux basses températures. De même, Corbel *et al.* (1999) ont observé une accumulation de cette VSP dans les stolons après un traitement au froid (5°C jour/ 0°C nuit) par comparaison avec des plantes témoin (20°C jour /15°C nuit).

**Chez la luzerne, l'accumulation automno-hivernale des VSP ne résulterait donc pas d'un effet direct des basses températures** (Figure VI-1). Il faut cependant préciser que les études menées chez le peuplier se déroulaient à des températures moins sévères que celles de notre expérimentation (14°C jour/ 8°C nuit) et se rapprochent donc davantage des conditions climatiques naturelles existant en climat tempéré à l'automne, période favorable à l'accumulation des VSP chez le peuplier et chez la luzerne.

Un essai a donc également été réalisé chez la luzerne à 14°C jour/ 8°C nuit pendant 35 jours (résultats non présentés) et a conduit à des résultats comparables à ceux obtenus lorsque les plantes sont placées à 5°C. Pour confirmer cette absence d'effet des basses températures sur l'accumulation des VSP, il faudrait étudier l'incidence d'un abaissement progressif des températures permettant une acclimatation des plantes au froid qui serait plus proche des conditions naturellement rencontrées en période automno-hivernale.

### **I-C- Héméropériode**

**Notre étude a mis en évidence que la réduction de l'héméropériode (de 16h à 8h)** entraîne une limitation de la croissance aérienne (Figures III-1 et IV-1), réduit l'absorption d'azote (Figure IV-2) et **modifie fortement la répartition de l'azote au sein de la plante** (Chapitre III, variété Europe ; Figure III-2) et cela, dès 28 jours de traitement (Chapitre IV, variétés Europe et Lodi ; Figure IV-3). L'azote est alors préférentiellement alloué vers le compartiment racinaire et plus spécifiquement vers le pivot, lequel constitue le principal organe de mise en réserve chez la luzerne (Kim *et al.*, 1993a) et le site majeur de fourniture de réserves azotées nécessaires à la phase initiale de repousse après une coupe (Ourry *et al.*, 1994). Contrairement aux basses températures, la

distribution préférentielle de l'azote vers le pivot suite à l'application de jours courts se traduit par un **stockage spécifique d'azote sous forme de VSP** (Figures III-4, III-5, III-6, IV-5 B, D).

De plus, ces résultats montrent que **l'accumulation des VSP dans le pivot de luzerne serait sous la dépendance des variations de statut de source ou de puits des organes pour l'azote**. De façon similaire, chez le peuplier, les nouvelles pousses de printemps constituent des puits prioritaires pour l'azote (Dickson *et al.*, 1985 ; Vogelmann *et al.*, 1985) conduisant à la dégradation de la BSP (Coleman *et al.*, 1993). Au contraire, si le développement des bourgeons axillaires est perturbé, la BSP peut alors s'accumuler.

L'étude cinétique de l'effet de l'héméroperiode courte pendant 28, 42 ou 56 jours sur deux variétés de luzerne (Europe et Lodi, Chapitre IV) a permis de confirmer les résultats préliminaires obtenus après 35 jours de traitement sur la variété Europe. La variété Lodi possède une plus grande capacité de repousse pendant les premiers jours suivant une coupe comparativement à la variété Europe (Lemaire et Allirand, 1993). De plus, les capacités plus élevées et plus rapides d'accumulation des réserves (amidon, azote total, VSP) de Lodi confèreraient à cette variété une plus grande tolérance à la défoliation (Avice *et al.*, 1997a, b).

**Dans cette étude, deux aspects ont donc été pris en compte :**

- **l'étude comparative entre deux cultivars en réponse à l'effet "jours courts" notamment pour l'accumulation des VSP.**
- **une première approche présentant une hypothèse sur la voie de perception du signal "jours courts" et des phénomènes impliqués dans la transduction de ce signal.**

Comparativement à Europe, Lodi présente au sein du pivot une teneur en protéines supérieure, que ce soit en jours longs ou en jours courts après 28 jours de traitement (Figure IV-5). Au niveau transcriptionnel, **la plus grande abondance des transcrits de VSP ( $\beta$ -amylase et VSP de 32 kDa) dès 28 jours de traitement en jours courts pour Europe et Lodi** (Figure IV-6) confirme l'effet inducteur de l'héméroperiode courte. Cet effet est également incontestable chez le peuplier pour lequel la BSP de 32 kDa et le transcrit correspondant s'accumulent dès 3 semaines de traitement (Van Cleve et Apel, 1993).

Cette étude permet de confirmer que, quelle que soit la variété, l'accumulation des VSP dans le pivot sous l'effet d'un raccourcissement de l'héméroperiode intervient dès 28 jours, avant même qu'une quelconque différence soit observée au niveau des protéines solubles totales (Figure IV-5). **Le traitement "jours courts" est donc bien un facteur d'induction spécifique de l'accumulation des VSP** (Figure VI-1).

D'autre part, il est important de rappeler que la variété Europe est cultivée dans le nord de la France alors que Lodi est un cultivar plutôt méditerranéen. Or, nos résultats ont montré que

l'application d'une héméroperiode courte stimule davantage l'accumulation des transcrits chez Europe que chez Lodi (Figure IV-6). Ainsi, cette analyse mettrait en évidence des variations de réponse aux jours courts selon l'origine géographique des plantes. Des résultats similaires ont été récemment rapportés chez le peuplier (Black *et al.*, 2001) grâce à une étude des niveaux des ARN des BSP réalisée chez 6 variétés de *Populus deltoides* originaires de latitudes différentes et toutes cultivées au même endroit en conditions naturelles. Le taux maximal d'expression des transcrits correspondant à la BSP est atteint d'autant plus tôt que les cultivars sont natifs de régions plus nordiques. Cette corrélation entre la date d'accumulation maximale des transcrits de BSP et l'origine géographique semble cohérente avec un arrêt de croissance et une acclimatation au froid plus précoce pour les arbres des latitudes les plus au nord (Black *et al.*, 2001).

**Ce phénomène analogue chez la luzerne pourrait traduire la capacité d'adaptation des plantes aux contraintes de l'environnement pour une conservation et une utilisation optimale de l'azote. D'autre part, la différence de réponse au traitement "jours courts" entre variétés pour l'accumulation des protéines et des transcrits tend à démontrer la complexité de la régulation de l'accumulation des VSP : elle interviendrait à plusieurs niveaux (transcriptionnel, post-traductionnel), et présenterait une variabilité génétique.**

L'étude de ces deux facteurs environnementaux (basses températures et héméroperiode) montre donc que **chez la luzerne, l'accumulation automno-hivernale des VSP semble être davantage sous l'influence du raccourcissement de la durée du jour que sous celle de l'abaissement des températures.**

Après avoir mis en évidence que le signal "jours courts" constitue un facteur inducteur majeur dans le phénomène d'accumulation des VSP, il semblait pertinent d'envisager une approche permettant de préciser les mécanismes impliqués dans la perception et la transduction de ce signal.

## **I-D- Recherche des mécanismes de perception et de transduction du signal "jours courts"**

### **I-D-1- Intervention du système phytochrome**

De nombreux travaux conduits chez le peuplier ont mis en évidence l'intervention du système phytochrome dans la perception du signal "jours courts" par les plantes (Zhu et Coleman, 2001a, b ; Chapitre I, § III-C-1). Dès lors, afin de vérifier cette hypothèse chez la luzerne, une étude préliminaire a été entreprise chez une des variétés (Europe) sur l'effet des flashes lumineux (lumière rouge et blanche) appliqués pendant 15 minutes au milieu de la phase nocturne de plantes placées en héméroperiode courte. Nous avons ainsi pu montrer que l'application de ces flashes réduit fortement le niveau d'expression des transcrits codant les VSP de 32 et 57 kDa dès 3 semaines de traitement (Figure IV-7).

**L'interruption de la phase nocturne par des flashes de lumière blanche ou de longueur d'onde rouge** chez les plantes placées en héméropériode courte semble donc **perturber la régulation du métabolisme des VSP et leur accumulation dans le pivot de luzerne**. Or ces flashes agissent directement sur les phytochromes (photorécepteurs qui perçoivent les variations qualitatives de la lumière chez les plantes ; Thomas et Vince-Prue, 1997). En s'appuyant sur les travaux relatifs au peuplier (Langheinrich et Tischner, 1991 ; Zhu et Coleman, 2001a, b) et sur nos propres observations, ces résultats préliminaires permettent d'émettre **l'hypothèse d'une perception du signal environnemental "jours courts", inducteur de l'accumulation des VSP de luzerne, par le système phytochrome au niveau aérien avant d'être transmis au niveau racinaire** (Figure VI-1).

Le mécanisme de transduction du signal "jours courts" à plus longue distance ainsi que les signaux impliqués dans la régulation de l'accumulation des VSP par les jours courts restent encore peu connus. Cependant, la modification de certains paramètres environnementaux conduit à une mise en réserve d'azote sous forme de VSP en engendrant de profondes modifications internes. Leur effet serait relayé au sein de la plante par des signaux endogènes parmi lesquels certaines phytohormones peuvent être impliquées (Staswick, 1994 ; Ourry *et al.*, 2001). Ainsi, plusieurs travaux récents dont certains ont été réalisés au cours de mon DEA et de cette thèse ont permis de tester le rôle potentiel de plusieurs d'entre elles.

#### **I-D-2- Implication de la balance hormonale ABA/GAs**

Le rapport entre l'acide abscissique (ABA) et les gibbérellines (GAs), qui agissent souvent en interaction, est associé à de nombreuses réponses physiologiques, induites par l'exposition aux jours courts, chez les ligneux (Rinne *et al.*, 1994 ; Li *et al.*, 2003) ou chez la pomme de terre (Jackson, 1999). Ainsi, **l'ABA, hormone inhibitrice de la croissance** dont la synthèse est inductible par de nombreux stress, est étudié depuis longtemps pour son implication potentielle dans l'acclimatation au froid et le développement de la dormance. Or, les jours courts constituent un signal intervenant dans ces deux processus adaptatifs essentiels pour la survie des plantes (Li *et al.*, 2002 ; 2003). Ainsi, Li *et al.* (2002) ont montré que l'effet de l'héméropériode courte sur l'arrêt de la croissance et l'acclimatation au froid du bouleau blanc d'Europe (*Betula pendula* Roth) s'accompagnait d'une augmentation de la teneur en ABA des tissus, suggérant l'implication de cette hormone dans le contrôle de ces processus par la photopériode.

Les GAs sont, quant à elles, impliquées dans de nombreuses étapes de la morphogenèse des plantes supérieures. Elles peuvent ainsi affecter la germination, l'élongation des tiges et des pétioles, l'induction florale, le développement des fruits et des graines (Hedden, 1999).

Il s'avère que certains facteurs environnementaux tels que la température et l'héméropériode pourraient intervenir *via* des modifications de réponse aux GAs et/ou des variations de leur teneur

(Olszewski *et al.*, 2002). Chez les ligneux, l'effet des jours courts sur l'arrêt de la croissance et la formation des bourgeons terminaux s'accompagne de la modification du métabolisme des GAs (Olsen *et al.*, 1997 ; Zhu et Coleman, 2001b). **Chez de nombreuses espèces, les teneurs en GAs sont plus élevées lorsque les jours sont longs en comparaison aux jours courts** (Jackson, 1999). Plus spécifiquement, des travaux chez le peuplier ont mis en évidence que la réponse à un raccourcissement de l'héméroperiode était relayée par le taux d'expression du gène du phytochrome A, lequel modifierait les teneurs endogènes des GAs (Olsen *et al.*, 1997) et le niveau d'ABA (Welling *et al.*, 2002).

D'après ces données, l'effet d'une application racinaire d'ABA (10  $\mu$ M) ou d'une pulvérisation foliaire d'un inhibiteur de la voie de la biosynthèse des GAs (Uniconazole) a été étudié chez la luzerne (Noquet, 1999). Dans les deux cas, ces traitements conduisent à une augmentation de la teneur en VSP du pivot de luzerne.

Dès lors, des études plus approfondies sur le rôle potentiel de ces deux phytohormones ont été entreprises avec un suivi en cinétique de l'effet d'un apport externe sur les deux variétés Europe et Lodi (Caillot, 2002). Ainsi, l'application d'ABA ou de certains inhibiteurs de la voie de synthèse des GAs (Ancymidol, Paclobutrazol, Tetcyclasis) affecte les capacités d'absorption de l'azote minéral et conduit à une allocation préférentielle de l'azote vers l'ensemble des organes souterrains (pivot et racines latérales). Un apport de 10  $\mu$ M d'ABA dans la solution nutritive pendant 21 jours provoque une forte diminution du rapport biomasse aérienne-biomasse racinaire en faveur d'une croissance racinaire accrue. Ceci s'accompagne d'une induction de l'accumulation des VSP et des transcrits correspondants (Caillot, 2002).

Il s'avère qu'une courte exposition à l'ABA (6 jours) suffit pour induire une augmentation significative des teneurs en VSP de 32 kDa par rapport aux plantes témoin et sans que cela soit suivi d'une accumulation des teneurs en protéines solubles totales du pivot. Le niveau d'expression du gène correspondant est significativement plus élevé dès 3 jours de traitement avec 5  $\mu$ M d'ABA et après 6 jours pour une concentration de 1  $\mu$ M (Caillot, 2002). La synthèse de la VSP du trèfle est également favorisée par l'application d'ABA : une application racinaire de 15  $\mu$ M provoque l'accumulation de la VSP de 17,3 kDa ainsi que de son transcrit (Goulas, 2001 ; Figure I-19).

**La rapidité et la spécificité d'action de l'ABA suggèrent que cette hormone puisse jouer un rôle direct sur l'expression du gène codant les VSP. Toutefois, la possibilité d'une action indirecte de l'ABA *via* les changements de statut source-puits ne peut pas être exclue.**

Par ailleurs, des travaux menés très récemment (Caillot, 2002) sur les plantes cultivées en situation d'héméroperiode courte ont permis d'étudier l'implication éventuelle des GAs dans la transduction du signal "jours courts". L'induction de l'accumulation des VSP et de l'expression des

gènes correspondants par les jours courts appliqués seuls n'est plus observé si les plantes sont en même temps pulvérisées avec des GAs (50  $\mu$ M d'un mélange de GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub>) pendant 3 semaines (Caillot, 2002). Ainsi, cela revient à mimer les jours longs puisqu'en conditions d'héméroperiode courte, les GAs induisent la croissance aérienne. Ces observations confirment ainsi les données précédemment rapportées par Zhu et Coleman (2001b) où l'expression des gènes *bsp*, accrue sous l'effet des jours courts, n'est plus observée chez le peuplier pulvérisé avec un mélange similaire de GAs pendant 8 semaines. Au contraire, le niveau de transcrits augmente si les plantes sont traitées avec un inhibiteur de la synthèse des gibbérellines (Paclobutrazol) alors qu'elles sont placées en conditions de jours courts avec application d'un flash de lumière blanche pendant la période nocturne (c'est à dire en conditions favorables à la croissance).

**Les GAs auraient, chez la luzerne, comme chez le peuplier un rôle inhibiteur de l'effet de l'héméroperiode courte. Ces différents résultats indiquent que la régulation de l'expression des gènes des VSP serait régie par les variations qualitatives de la lumière qui provoquent des modifications des relations source-puits *via* l'intervention des GAs.**

Ainsi, l'héméroperiode courte, facteur d'induction de l'accumulation des VSP, agirait sur le métabolisme des Gas, et l'inhibition de leur synthèse serait une des premières étapes conduisant à l'arrêt de la croissance (Olsen *et al.*, 1997). Les changements dans les relations source-puits en résultant constitueraient alors le signal d'activation des gènes des VSP (Zhu et Coleman, 2001b).

D'autre part, l'effet des GAs peut être inhibé par l'ABA (Olsen *et al.*, 1992). Face à cet antagonisme, il est généralement admis que le rôle de l'ABA ou des GAs résulte en fait d'un équilibre entre ces deux types de régulateurs de croissance. Cette étude préliminaire démontrant l'effet de chacun d'entre eux laisse supposer que le rapport ABA/GAs puisse être un élément déterminant dans la régulation de la synthèse des VSP chez la luzerne (Figure VI-1). L'étude des interactions entre la transduction du signal des GAs et de l'ABA est désormais envisageable. Kwon et Na (2001) ont en effet récemment mis en évidence l'induction rapide (en 15h) des gènes de VSP chez l'arabette des dames après la pulvérisation de 10  $\mu$ M de GA<sub>3</sub> ou de 20  $\mu$ M d'ABA sur un mutant de 10 jours déficient pour la synthèse de ce type de GAs. Au contraire, chez le type sauvage, l'application de GA<sub>3</sub> inhibe l'expression des gènes de VSP 2 alors que celle d'ABA stimule la synthèse des transcrits de VSP 1 et VSP 2 (Kwon et Na, 2001).

**En conséquence, l'ensemble de ces travaux permet de mettre en évidence l'intervention des signaux hormonaux en lien avec les relations source-puits qui modèleraient l'expression des gènes des VSP de la luzerne et agiraient sur la mise en réserve d'azote, relayant ainsi l'effet de contraintes environnementales (Figure VI-1).**

### **I-E- Rôle du MeJA**

Plusieurs études relatives à la régulation de l'accumulation des VSP dans les organes de réserve font état du rôle des phytohormones telles que l'auxine chez le soja (De Wald *et al.*, 1994), les gibbérellines notamment chez le peuplier (Zhu et Coleman, 2001b) ou l'arabette des dames (Kwon et Na, 2001) et l'ABA chez le trèfle (Goulas, 2001) ou la luzerne comme nous l'avons rapporté dans le paragraphe précédent. Parmi les autres phytohormones susceptibles d'intervenir dans la stimulation de la synthèse de VSP, le MeJA a fait l'objet de plusieurs études pour son implication en tant que signal endogène servant de relais à l'action des signaux environnementaux sur l'accumulation des VSP chez le soja (Mason et Mullet, 1990 ; Anderson, 1991 ; Staswick, 1994), l'arabette des dames (Berger *et al.*, 1995), le peuplier (Beardmore *et al.*, 2000) ou le colza (Rossato *et al.*, 2002a, b) (cf Chapitre I ; § III-C-5-b). Les jasmonates, produits de manière naturelle au niveau des organes reproducteurs (Staswick, 1994 ; Creelman et Mullet, 1997), interviennent dans le développement et l'élaboration des tissus reproducteurs (Creelman et Mullet, 1997), la protection contre les insectes et les pathogènes (Farmer et Ryan, 1990 ; Mc Conn *et al.*, 1997) et la limitation des effets de facteurs abiotiques tels que l'ozone (Rao *et al.*, 2000).

Chez la luzerne, nous avons donc entrepris d'étudier l'incidence d'un **apport racinaire de MeJA (100  $\mu$ M)** pendant 35 jours. Ce traitement conduit à une **répartition préférentielle de l'azote vers les parties racinaires**, en particulier le pivot (Figure III-2). Ceci s'accompagne d'une augmentation de la teneur en protéines solubles (Figure III-3) concomitante **d'une accumulation de VSP** dans cet organe (Figure III-4 et III-5) **alors que les niveaux de transcrits de la  $\beta$ -amylase restent, quant à eux, faibles** (Figure III-6). Ce résultat tendrait donc à montrer que l'effet du MeJA se manifeste *via* un changement de statut source ou puits des organes, qui conduirait lui-même à la synthèse de VSP.

Des études récentes menées au laboratoire sur l'impact de la durée de traitement et de l'effet dose de MeJA (Meuriot *et al.*, 2003b) ont cependant permis de préciser nos résultats préliminaires. Ainsi, un apport racinaire de 10 ou 100  $\mu$ M de MeJA induit une augmentation spécifique des teneurs en VSP du pivot (d'un facteur 2) alors qu'il est sans incidence sur les teneurs en protéines solubles totales après 7 jours de traitement. De plus, un traitement de 7 jours à 100  $\mu$ M permet d'accroître le niveau de transcrits de la  $\beta$ -amylase et de la VSP de 32 kDa. L'abondance relative des transcrits de ces deux VSP décroît lentement après 21 jours de traitement mais les niveaux restent cependant 2 fois plus élevés que ceux des plantes témoin. L'accumulation des VSP engendrée par le MeJA se produit avant toute modification de répartition de la biomasse, de l'azote entre organes, et avant toute augmentation de la teneur en protéines solubles du pivot, lesquels n'apparaissent qu'après 14 ou 21 jours de traitement à 100  $\mu$ M (Meuriot *et al.*, 2003b).

L'ensemble de ces travaux permet alors de discerner deux modes d'intervention du MeJA chez la luzerne. Tout d'abord, il aurait un effet inducteur direct sur l'expression des gènes codant les VSP. D'autre part, il jouerait un rôle indirect en favorisant une allocation préférentielle d'azote vers le pivot. Cette redistribution serait consécutive à une diminution de l'absorption d'azote et conduirait à une augmentation des teneurs en protéines solubles et VSP, suite à un bouleversement des relations source-puits. De même, Beardmore *et al.* (2000) ont montré qu'une pulvérisation de MeJA chez le peuplier, conduit à une réponse rapide (72h) en terme d'accumulation des transcrits de la VSP et de la protéine correspondante dans les feuilles et les tiges de jeunes plantes. De plus, le MeJA présente un effet à plus long terme, aboutissant à une répartition préférentielle de la biomasse vers les tiges sans incidence sur la croissance relative du peuplier ainsi qu'à une augmentation de l'accumulation des protéines solubles, des teneurs en azote et en VSP.

**Le MeJA aurait donc chez la luzerne un mode d'action à la fois direct et indirect** (Figure VI-1), similaire aux conclusions rapportées sur le peuplier (Beardmore *et al.*, 2000) et sur le soja (Mason et Mullet, 1990 ; Staswick *et al.*, 1991 ; Franceschi et Grimes, 1991).

Les mécanismes de défense et de réponse à la blessure sont recensés parmi les différents processus physiologiques dans lesquels l'acide jasmonique ou le MeJA peuvent être impliqués, notamment en stimulant la synthèse de nombreuses PR-protéines. Or, le clone ADNc correspondant à la VSP de 32 kDa du pivot de luzerne récemment isolé (Volenc *et al.*, 2002 ; Meuriot *et al.*, 2003b) révèle une forte homologie de séquence (75 % d'identité) avec une chitinase de classe III isolée chez une légumineuse tropicale (*Sesbania rostrata* ; Goormachtig *et al.*, 1998). De plus, la VSP de 32 kDa présente une activité chitinase *in vitro* et la fraction purifiée sur colonne de chitine est spécifiquement reconnue par l'anticorps anti-32 kDa (Meuriot *et al.*, 2003b). Dès lors, la stimulation de l'expression du gène de la VSP de 32 kDa du pivot de luzerne associée à la mise en évidence de l'activité chitinase de cette protéine suggèrent une induction de l'expression d'une chitinase par le MeJA dans le pivot de luzerne. Ces observations se rapporteraient alors au rôle adaptatif des VSP synthétisées en réponse à la blessure ou à l'attaque d'un pathogène précédemment décrit par Staswick (1994) et Creelman et Mullet (1997). En effet, la blessure appliquée au niveau foliaire constitue également un facteur de stimulation de la synthèse des VSP chez le soja (Mason *et al.*, 1992), l'arabette des dames (Berger *et al.*, 1995) ou encore le peuplier (Davis *et al.*, 1993).

**Ainsi, chez la luzerne, le MeJA répertorié comme un facteur d'induction de la synthèse de VSP dans le pivot pourrait être impliqué spécifiquement pour son rôle de signal dans les mécanismes de défense contre les pathogènes en régulant l'expression d'une des VSP présentant potentiellement cette fonction supplémentaire.**

Ceci permettrait d'attribuer un double rôle à la VSP de 32 kDa comme cela est déjà décrit dans la littérature pour plusieurs autres VSP (cf Chapitre I, § III-B-2), notamment chez le pissenlit

(Xu *et al.*, 2000), la patate douce (Yeh *et al.*, 1997), la pomme de terre (Tonón *et al.*, 2001), ou l'oca du Pérou (Flores *et al.*, 2002). Il faut cependant être prudent puisque la structure ne définit pas nécessairement la fonction. Il serait en effet excessif d'émettre des hypothèses de fonctionnement sur la base unique de similitudes entre séquences (Volenc *et al.*, 2002). Ainsi, chez la luzerne, le gène de la VSP de 32 kDa présente des similitudes de séquence avec les chitinases de type III alors que ce sont plutôt les gènes des chitinases de type I, II et IV dont l'expression est accrue en cas d'attaque de pathogènes. Les chitinases de type III interviennent dans des associations symbiotiques avec certains champignons permettant de favoriser l'absorption d'azote chez la luzerne tronquée (*Medicago trunculata*) (Volenc *et al.*, 2002). Néanmoins, Couture *et al.* (2002) ont récemment rapporté que des luzernes étaient d'autant plus sensibles au *Fusarium* (champignon pathogène responsable de la fusariose au niveau du collet et du pivot de luzerne) que le niveau de réserves protéiques (incluant la VSP de 32 kDa) était réduit suite à l'application d'une coupe automnale supplémentaire (Dhont *et al.*, 2003). Des données récentes ont également montré que cette VSP de 32 kDa, en conditions hivernales, s'accumule à un niveau très élevé chez une variété endurcie au froid (AC Caribou) acclimatée en conditions hivernales naturelles (Dhont *et al.*, 2003). Ces résultats et le fait que certaines chitinases puissent jouer le rôle de protéines antigel (AFP pour antifreeze protein) en participant aux processus de protection contre le gel (Yeh *et al.*, 2000), laissent penser que la VSP de 32 kDa du pivot de luzerne pourrait potentiellement jouer un rôle dans les processus de tolérance au froid.

**Il semble donc que certaines VSP ne joueraient pas seulement un rôle de réserve pendant des périodes particulières du développement de la plante, mais pourraient également intervenir dans les mécanismes de défense en tant que PR-protéines ou dans les phénomènes de tolérance au froid** (Figure VI-1). L'ensemble de ces résultats confirme donc la nécessité de remettre en cause la définition initiale de VSP établie par Staswick (1994) qui mentionnait toute absence d'activité catalytique attribuée à ces protéines de réserve des organes végétatifs.

## **II- REGULATION DE L'ACCUMULATION DE LA VSP CHEZ LE COLZA**

Le colza d'hiver, plante bisannuelle, possède une forte capacité d'absorption de l'azote minéral, cependant, le transfert de cet élément vers les tissus récoltés semble se faire de façon moins intense que pour d'autres espèces (ce qui se traduit par un faible indice de récolte ou nitrogen harvest index pour les anglo-saxons). Ainsi, Schjoerring *et al.* (1995) rapportent que seulement la moitié de l'azote apporté par la fertilisation est utilisée par les graines. Ce constat associé au fait que les feuilles peuvent chuter au cours de la période hivernale (Dejoux *et al.*, 2000) et après floraison avec une teneur élevée en azote (2 %) révèlent que la valorisation de l'azote par cette plante de

grande culture est relativement médiocre. Les risques de pollution nitrique par lixiviation ainsi engendrés ont des conséquences néfastes pour l'environnement.

Par ailleurs, des études récentes visant à quantifier les flux d'azote au sein des plantes, ont été menées au laboratoire sur un cycle complet de développement du colza d'hiver (variété Capitol) en conditions contrôlées grâce à l'utilisation d'un marquage continu à l'azote 15 (Rossato *et al.*, 2001). Ces travaux rapportent la présence d'un pool mobile d'azote dans la hampe florale et le pivot entre la montaison (stade C1) et la fin de la floraison (stade G1). Cet azote est issu de l'absorption mais provient également de la sénescence foliaire. Il s'avère qu'à partir de la floraison, les capacités d'absorption de l'azote sont réduites (cf Chapitre I, § II-B-2). Dès ce moment, le remplissage des graines semble donc majoritairement dépendre de la remobilisation des composés azotés préalablement stockés dans les organes végétatifs (Diepenbrock, 2000), d'ailleurs 48 % de cet azote se retrouvent dans les siliques (Rossato *et al.*, 2001). Ce phénomène est caractéristique des plantes annuelles chez lesquelles les réserves constituées par la plante sont mobilisées de manière ultime, au cours de la sénescence, pour le développement des graines (Thomas *et al.*, 2002 ; Buchanan-Wollaston, 1997 ; 2003). La remobilisation de l'azote foliaire vers les autres parties de la plante puis vers les graines représente donc un mécanisme capital comme l'illustrent de nombreux exemples chez les céréales en particulier chez le maïs (*Zea mays* L.) (Crawford *et al.*, 1982).

Dès lors, l'amélioration du potentiel de mise en réserve d'azote pourrait présenter un double intérêt. En effet, une bonne gestion de cette capacité de stockage à certaines périodes du développement pourrait contribuer à améliorer l'efficacité d'utilisation de l'azote par la plante et par conséquent permettre - notamment par un apport raisonné de fertilisants azotés - de diminuer les risques de retour vers l'environnement.

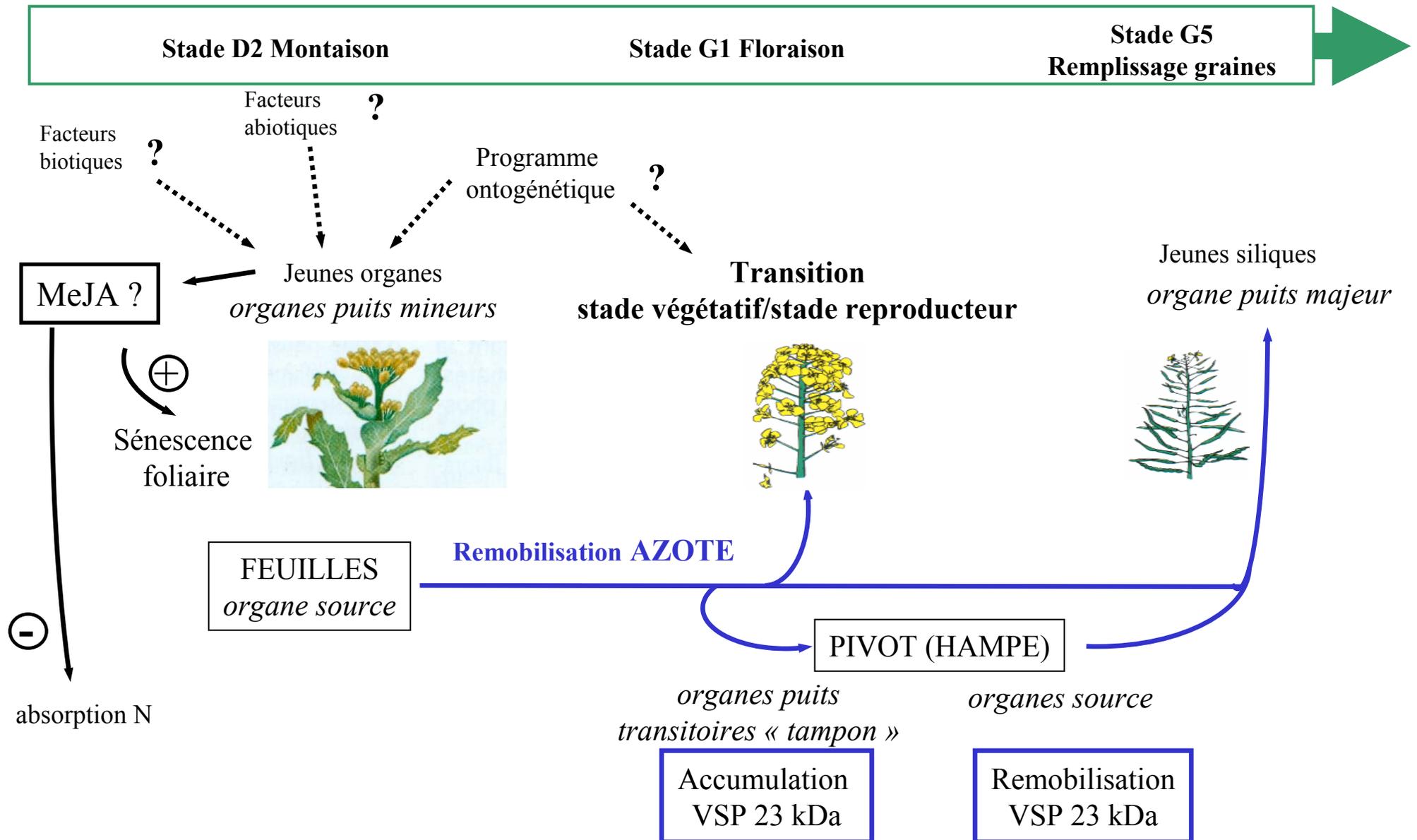
Grâce à des analyses des profils électrophorétiques des protéines du pivot de colza, Rossato *et al.* (2001) ont montré l'implication d'une VSP de 23 kDa dans le stockage transitoire d'azote lors du passage du stade végétatif au stade reproducteur. Son accumulation est maximale à la fin de la floraison. Ainsi, cette mise en réserve semble partiellement issue d'un recyclage interne de l'azote des feuilles sénescentes alors que son absorption se trouve diminuée et que la demande des organes puits principaux (c'est-à-dire les siliques) est encore faible. Cette VSP est ensuite remobilisée lors du remplissage des graines. Une étude réalisée au champ a permis de montrer que la VSP de 23 kDa s'accumule également de façon massive chez la variété Capitol dès le mois d'Avril en stockant l'azote issu des feuilles sénescentes dans le pivot pour le réutiliser ensuite progressivement lors du remplissage des siliques (Rossato, 2000). Ainsi, la capacité du colza à mettre en réserve l'azote de façon transitoire sous forme de VSP, permettrait de conserver l'azote assimilé en limitant les pertes de cet élément occasionnées par la chute des feuilles. Cet azote serait ensuite remobilisé lorsque la force puits développée par les siliques devient suffisamment élevée.

La synthèse de VSP semble être régulée en fonction du stade de développement des plantes comme chez l'arabette des dames (Utsugi *et al.*, 1998) ou la chicorée (Améziane *et al.*, 1997), et plus spécifiquement par le statut source-puits des différents organes vis-à-vis de l'azote (Coleman *et al.*, 1992). Ourry *et al.* (2001) ont souligné que le cycle accumulation/mobilisation caractéristique des VSP doit être parallèle au flux d'azote entre les organes source et puits de la plante. Ces auteurs définissent un organe puits comme un tissu importateur net d'azote avec potentiellement une synthèse et une accumulation de composés azotés de réserve. Cet organe devient exportateur net d'azote (organe source) en provoquant la mobilisation de son azote lorsque la demande pour la croissance n'est pas satisfaite par d'autres voies d'acquisition.

Différentes études portant sur les effets d'une réduction de la croissance aérienne chez le peuplier (Zhu et Coleman, 2001b), de la suppression des siliques chez le soja (Tranbarger *et al.*, 1991 ; Staswick, 1994) ou de l'élimination des bourgeons chez la pomme de terre (Paiva *et al.*, 1983), le soja (Stephenson *et al.*, 1998) ou le peuplier (Coleman *et al.*, 1993) vont dans le sens d'une stimulation de la synthèse des VSP lorsque le rapport source-puits est expérimentalement réduit. Par exemple, Wittenbach a démontré que les VSP de 27 et 29 kDa du soja constituent entre 6 et 15 % de l'ensemble des protéines solubles au moment de la floraison pour ne plus représenter que 1 % lors du développement des graines (Wittenbach, 1983). La suppression des organes puits majoritaires par élimination des graines des gousses de soja entraîne une forte accumulation des VSP qui peuvent alors représenter jusqu'à 50 % de l'ensemble des protéines solubles totales (Staswick, 1990 ; Mason et Mullet, 1990). Chez le peuplier, l'accumulation de la BSP est maximale à l'automne au moment de la sénescence foliaire et ces protéines ne sont dégradées que lorsque la demande en azote des nouvelles pousses (qui constituent des puits prioritaires pour l'azote) doit être satisfaite lors de la reprise de croissance au printemps.

Ces différents éléments nous ont amenés à supposer que les mécanismes de régulation de l'accumulation de la VSP chez le colza pouvaient également être resitués de façon plus globale dans le cadre des relations source-puits établies au cours du développement vis-à-vis de l'azote. C'est pourquoi nous avons entrepris une expérimentation en conditions de plein champ permettant l'étude de ces relations chez la variété Capitot. Cette expérimentation devait dans un premier temps nous permettre d'affiner la cinétique d'accumulation/mobilisation de la VSP de 23 kDa sur la variété Capitot lors de la phase de transition entre le stade végétatif et le stade reproducteur de la plante déjà abordée par Rossato (2000).

Puis, afin de décomposer les phénomènes impliqués, nous avons perturbé le cycle ontogénétique des plantes en supprimant certains organes source ou puits pour l'azote à un stade phénologique précis ou au fur et à mesure de leur apparition. Nous avons ainsi pu analyser l'impact de ces traitements sur l'utilisation de l'azote pour la croissance, sa mise en réserve et le



**Figure VI-2 :** Schéma hypothétique des relations source-puits pour l'azote sur l'induction de l'accumulation et de la remobilisation de la VSP dans les organes « tampon » (pivot et hampe) du colza.

développement de la plante. Cette étude devait nous permettre d'approfondir les connaissances sur la mobilisation de l'azote foliaire (avant la floraison) et lors du remplissage des siliques par une suppression de la moitié des feuilles de la rosette, source d'azote au moment de la constitution potentielle de réserve au sein du pivot. Par ailleurs, la hampe florale constitue l'organe bénéficiant majoritairement de la remobilisation de l'azote issu des feuilles sénescentes (51 %) au cours de la montaison (à partir du stade C1) et jusqu'à la fin de la floraison (G1) (Rossato *et al.*, 2001). Nous avons donc étudié l'impact de la suppression de cet organe alors qu'il joue le rôle de puits sur la redistribution éventuelle d'azote vers d'autres organes, et son accumulation potentielle sous forme de VSP dans le pivot. Enfin, par l'ablation des puits majeurs - les organes reproducteurs (inflorescences et siliques) -, nous voulions tester la possibilité pour la plante d'augmenter sa capacité de mise en réserve dans les organes végétatifs en y suivant l'accumulation éventuelle de la VSP.

Les plantes présentant un développement normal ont constitué les plantes témoin de notre expérimentation. Notre étude s'est déroulée depuis le début de la montaison (stade D1) jusqu'à la maturation des siliques (stade G5), avec un suivi sérié à chaque changement de stade phénologique observé chez le témoin. Une méthode de marquage à l'azote 15 sur une période de 7 jours précédant chaque récolte nous a permis de réaliser un suivi de l'absorption et de l'établissement de priorités entre les différents organes puits pour la répartition de cet azote nouvellement absorbé au cours du développement.

Ainsi, les principales conclusions qui ressortent de ce travail sont rapportées et discutées dans les chapitres suivants. Comme pour la luzerne, la contribution de ce travail de thèse à la compréhension des mécanismes de mise en réserve transitoire sous forme de VSP chez le colza est présentée sous la forme d'un schéma récapitulatif dans la figure VI-2.

### **II-A- Cycle ontogénétique normal**

Nos résultats montrent que chez les plantes dont le développement n'est pas perturbé, la **croissance et la quantité d'azote totale augmentent jusqu'à la fin du développement** (Figures V-1 et V-2). Par ailleurs, l'absorption d'azote (Figure V-3) est globalement plus faible à partir du début de la floraison (mi-Avril), cependant, il ne s'agit pas d'un arrêt complet de l'absorption contrairement à ce qui est rapporté dans de précédentes études réalisées en conditions contrôlées (cf Chapitre I, § II-B-2 ; Rossato *et al.*, 2001).

D'après notre étude, **pendant la montaison, l'azote issu de l'absorption est réparti par ordre préférentiel vers les feuilles, la hampe et le pivot ; ensuite, ce sont les organes reproducteurs, fleurs puis siliques qui deviennent les puits principaux** (Figure V-4). Il faut préciser que la répartition de l'azote absorbé sur les 7 jours précédant chaque récolte reflète

parfaitement la répartition de l'azote total (résultats non présentés). Enfin, ce travail nous a permis de préciser sur une échelle cinétique plus précise l'évolution du **cycle accumulation/remobilisation** de la protéine de 23 kDa (Figure V-6) décrite préalablement comme VSP lors d'études menées en conditions contrôlées (Rossato *et al.*, 2001) et au champ grâce à un relevé mensuel (Rossato, 2000). Nos points de prélèvement rapprochés (quasiment hebdomadaires) nous ont ainsi permis de confirmer que chez la **variété Capitot**, cette **VSP s'accumulait au niveau du pivot et devenait majoritaire à la mi-Avril avant d'être ensuite progressivement remobilisée pendant le remplissage des siliques** (Figure VI-2).

## **II-B- Effet d'une réduction de la quantité de tissus source**

### ▪ *Suppression de 50 % des feuilles de la rosette :*

Par rapport au cycle ontogénétique normal (plantes témoin), **la suppression de la moitié des feuilles de la rosette au stade D2** (considérées comme des organes source notamment pour le développement de la hampe et des inflorescences, Rossato *et al.*, 2001) provoque une **chute de la quantité d'azote total par plante** (Tableau V-I). Le développement des plantes est retardé - la biomasse des inflorescences est plus faible et la floraison se prolonge par rapport aux plantes témoin - même si la perte des feuilles a été rapidement compensée par une biomasse foliaire redevenant très vite équivalente à celle du témoin (Figure V-1). La quantité d'azote absorbée est plus élevée pendant la floraison et le développement des siliques (Tableau V-II) et un **plus fort pourcentage d'azote est alloué aux feuilles** (Figure V-4). Par conséquent, la demande des feuilles étant plus élevée, l'azote, qu'il provienne de l'absorption ou du recyclage foliaire, est alloué vers le pivot de façon moins précoce. Cela se traduit par une mise en réserve de l'azote moins importante dans cet organe et **une accumulation de la VSP à la fois plus tardive et moins marquée que chez le témoin** (Figure V-6 B, C).

Des résultats similaires ont été observés chez l'euphorbe âcre (*Euphorbia esula*) : lorsque des plantes sont décapitées et défoliées à l'automne, la synthèse de la VSP est alors retardée d'au moins un mois par rapport aux plantes témoin (Cyr et Bewley, 1990a). La demande en azote des organes en croissance (essentiellement des feuilles) est plus forte que celle des organes racinaires où la mise en réserve est par conséquent plus tardive et moins forte.

Dans notre étude portant sur le colza, le fait que l'accumulation de la VSP soit plus faible après élimination d'une partie des feuilles, laisse supposer que l'azote accumulé sous forme de VSP **serait bien issu de la remobilisation de l'azote des feuilles sénescentes** avant la floraison (plutôt qu'issu directement de l'absorption) alors que les organes reproducteurs ne présentent pas encore une forte demande et ne constituent donc pas les organes puits majoritaires.

Chez la pomme de terre, la formation des protéines de réserve des tubercules dépend exclusivement de la remobilisation de l'azote des feuilles (Millard *et al.*, 1989). Par ailleurs, nos constatations se rapprochent de celles faites chez les ligneux. En effet, de nombreuses études indiquent qu'à l'automne, l'azote des feuilles sénescentes est récupéré avant leur abscission. Les protéines foliaires sont hydrolysées avec un taux de dégradation de 50 % chez le pommier (Kang et Titus, 1980) et le peuplier (Côté et Dawson, 1986) et les acides aminés qui en résultent sont transportés vers les tissus pérennes (au niveau de l'écorce) puis mis en réserve sous forme protéique (Taylor et May, 1967, Chapin et Kedrowski, 1983). Dès lors, les teneurs en protéines dans l'écorce augmentent de façon considérable, jusqu'à plus de 200 % chez le pommier (Kang et Titus, 1980). L'azote ainsi mis en réserve sous forme de BSP est ensuite remobilisé au printemps pour la reprise de croissance. Le stockage saisonnier d'azote constitue alors un moyen de le conserver et permet potentiellement de contribuer à améliorer l'efficacité de son utilisation (Chapin et Kedrowski, 1983).

Cependant, plus récemment, Staswick *et al.* (2001) ont démontré par l'utilisation de technique "anti-sens" permettant d'empêcher leur synthèse, que les VSP du soja, en conditions normales de croissance, ne jouaient qu'un rôle mineur sur la productivité des graines, que ce soit en conditions contrôlées ou au champ (les plantes étant toutefois abondamment pourvues en éléments minéraux et azotés en particulier). Chez les ligneux, même si les BSP contribuent à l'augmentation de production de biomasse (Binnie *et al.*, 1994) et que la période de leur dégradation est corrélée avec la date de débourrement (Langheinrich et Tischner, 1991), elles ne sont pas les seules protéines à être mobilisées pour le développement des nouvelles pousses (Langheinrich, 1993). Ainsi, d'un point de vue quantitatif, les travaux de Gomez et Faurobert (2002) ont en effet permis de préciser que les VSP du pêcher ne constituent pas la principale forme de stockage d'azote. En revanche, parmi les différents pools d'azote mobilisables, ces auteurs ont montré que cette fraction azotée est rapidement et préférentiellement mobilisée pour la reprise de croissance au printemps, ce qui lui conférerait plutôt un rôle qualitatif.

Nos résultats montrent toutefois que **lorsque la moitié des feuilles de la rosette du colza est supprimée, l'accumulation de VSP est moindre et que les plantes présentent une plus faible production de siliques par rapport aux plantes témoin (environ 30 % inférieure)** lors de la récolte finale en fin de développement (Figure V-1). Ceci tend à montrer l'importance de l'azote précédemment accumulé dans les organes végétatifs pour le remplissage des graines. Ainsi, chez le maïs, 60 à 80 % de l'azote de l'épi proviennent de la remobilisation à partir de la tige et des feuilles (Masclaux *et al.*, 2001). Des études utilisant un marquage isotopique de l'azote chez le colza en conditions contrôlées ont montré que l'azote des feuilles sénescentes est finalement retrouvé dans les graines (Kullmann et Geisler, 1986 ; Zhang *et al.*, 1991 ; Rossato *et al.*, 2001). De plus, Kullmann et Geisler (1986) supposent que ce processus d'exportation d'azote depuis les organes

végétatifs vers les graines constituerait le point d'initiation du développement des organes reproducteurs et des graines. D'autres études examinant l'incidence d'une défoliation sur le rendement du colza ont mis en évidence que les feuilles (source majeure d'assimilats C et N) contribueraient à l'élaboration de la biomasse des graines (Rood *et al.*, 1984a). Ainsi, la suppression d'une partie d'entre elles peut expliquer une perte d'azote significative au niveau des organes reproducteurs. Hocking *et al.* (1997) ont mené des expérimentations sur colza au champ sur deux saisons en utilisant différents niveaux de fertilisation azotée. Cette étude rapporte que 52 % de la quantité d'azote retrouvée dans la plante mature sont accumulés avant la floraison et qu'environ 17 % de la matière sèche des graines sont élaborés *via* la remobilisation à partir de la hampe et des feuilles. En moyenne, la proportion d'azote mobilisé à partir des feuilles vers les graines est de l'ordre de 65 % (Zhang *et al.*, 1991 ; Hocking *et al.*, 1997). Habekotté (1993) a montré une forte corrélation entre la densité de siliques et la production totale de matière sèche au début et à la fin de la floraison (autrement dit la disponibilité totale en assimilats dans la période antérieure à leur développement). Ainsi, la matière sèche produite jusqu'à la floraison du colza contribue à la croissance des siliques *via* la mobilisation de substances transitoirement stockées dans les organes végétatifs (Diepenbrock, 2000).

**L'ensemble de ces éléments associé à nos résultats confirment donc l'importance des feuilles présentes au début de la montaison comme fournisseurs d'assimilats qui sont ensuite mobilisés pour le développement des siliques. Ceci se ferait au moins en partie *via* une mise en réserve transitoire au sein des organes végétatifs qui se manifeste par l'accumulation de VSP au niveau du pivot (Figure VI-2).**

### **II-C- Effet d'une réduction de la quantité de tissus présentant des caractéristiques de puits pour l'azote**

- *Suppression des organes reproducteurs :*

Lors du développement du colza, après la fin de la floraison, les graines constituent les tissus dont la demande en azote est la plus forte. De plus, elles contiennent de loin la plus grande proportion (en général 80 %) de l'azote contenu dans la plante à maturité (Rood *et al.*, 1984b ; Schjoerring *et al.*, 1995 ; Hocking *et al.*, 1997). Dès lors, tout traitement limitant la formation des siliques est susceptible d'engendrer des modifications de la gestion en azote par la plante et peut donc potentiellement présenter des conséquences marquées sur le statut source-puits des tissus végétatifs.

Nous avons donc entrepris d'étudier l'incidence de l'ablation des organes reproducteurs dans leur ensemble (inflorescences ou siliques).

L'élimination des **inflorescences ou des siliques** au fur et à mesure de leur apparition induit une **forte augmentation de la croissance des feuilles et de la hampe, par production de nouvelles ramifications**, comparativement aux plantes témoin (Figure V-1). Cela se traduit par une absorption d'azote qui se maintient à un niveau plus élevé et sur une période plus longue pour les plantes sans inflorescences (Tableau V-II). De plus, **l'azote est préférentiellement alloué vers les feuilles puis vers la hampe** chez les plantes dépourvues de fleurs ou de siliques (Figure V-4). Des résultats semblables relatant une augmentation de la croissance des racines, de la hampe et des feuilles ont été obtenus par Rood *et al.* (1984a) suite à la suppression quotidienne des siliques en conditions contrôlées.

En conditions normales de développement, la production de feuilles cesse théoriquement dès le début de la floraison (Hocking *et al.*, 1997). Nos résultats montrent que les traitements appliqués prolongent cette période alors que les plantes témoin présentent une baisse de la biomasse foliaire traduisant leur chute suite au processus de sénescence (Figure V-1). Il faut cependant préciser que cette chute de feuilles n'a pas été quantifiée précisément ni de façon continue au cours de notre expérimentation. Pour autant, **ces analyses suggèrent que la suppression continue des organes reproducteurs provoque un ralentissement du mécanisme de sénescence foliaire massive** si l'on se réfère notamment à la présence de feuilles maintenues vertes **et de la mobilisation des composés azotés qui en sont issus**. Ces traitements ont donc maintenu la distribution de l'azote vers la hampe et les feuilles en comparaison avec les plantes témoin. **Ces parties aériennes constituent alors des puits alternatifs qui se substituent aux puits reproducteurs manquants, ce qui se traduit par une croissance qui perdure**.

Selon Wittenbach (1982) et Buchanan-Wollaston (1997) l'élimination des puits en développement a un effet répressur sur la sénescence foliaire. Cependant, plusieurs études réalisées chez le soja précisent que si le niveau de sénescence foliaire est diminué en l'absence des fruits, sa date de démarrage n'est pas modifiée par rapport à des plantes témoin (Crafts-Brandner et Egli, 1987a, b). En fait, la suppression des siliques chez le soja provoquerait un changement de statut de l'organe foliaire plutôt que de retarder l'arrêt de son fonctionnement (Wittenbach, 1982). En effet, ce constat est associé à l'observation d'une abondante synthèse de VSP de 27, 29 kDa et 94 kDa dans les feuilles de soja qui deviennent alors des organes puits servant pour le stockage (Wittenbach, 1982 ; 1983 ; Staswick, 1989 ; Kato *et al.*, 1993).

Chez le colza, la suppression des inflorescences ou des siliques empêche dans un premier temps une sénescence foliaire massive qui survient toutefois à la fin de l'expérimentation. En effet, au cours du mois de juin, la biomasse foliaire diminue considérablement pour les plantes ayant subi ces ablations, ce qui traduit une mobilisation tardive de l'azote des feuilles. L'absence des organes

puits reproducteurs a donc visiblement conduit à une allocation de cet azote vers les organes végétatifs. **La hampe et le pivot** deviennent alors des **puits alternatifs vers lesquels l'azote nouvellement absorbé** (Figure V-4) **ou l'azote total** (résultats non présentés) **sont préférentiellement et largement distribués à la fin de l'expérimentation** (c'est-à-dire à partir de fin Mai). Ceci conduit alors à une **forte accumulation de la VSP de 23 kDa dans le pivot** (Figure V-6 B, C). Jusqu'alors, la VSP n'était pas observée chez les plantes sans inflorescence alors qu'elle était accumulée de façon maximale pendant le mois d'Avril chez les plantes témoin. **Que ce soit en absence d'inflorescences ou de siliques, l'accumulation de la VSP est maximale fin Juin et cette VSP apparaît même dans la hampe** (Figure V-6B, C et V-7).

Il faut cependant noter que l'accumulation massive de la VSP suite à la suppression des organes reproducteurs est tardive (fin Juin alors que les inflorescences ont été éliminées à partir de fin Mars). L'effet de la suppression des siliques sur l'accumulation de la VSP n'est visible dans le pivot qu'un mois après le début du traitement (c'est-à-dire seulement à partir de fin Mai). En comparant 2 variétés de colza (Colosse et Capitool) en conditions de plein champ, Rossato (2000) a montré que chez Colosse, association variétale caractérisée par la production de nombreuses ramifications, l'accumulation de la VSP n'est pas observée contrairement à Capitool (lignée pure). Dans notre étude, la suppression des organes reproducteurs conduit à une augmentation importante de la biomasse par l'apparition de nouvelles ramifications sur lesquelles se développent encore des inflorescences alors que la floraison des plantes témoin est terminée. Ainsi, l'azote est essentiellement alloué vers les parties aériennes pour satisfaire les besoins de ces nouvelles pousses en croissance, comme dans le cas de la variété Colosse et cela, au détriment de son stockage au niveau du pivot.

Contrairement aux plantes témoin, **la VSP n'est pas remobilisée après son accumulation chez les plantes ayant subi l'ablation des organes reproducteurs**. En effet, comme Rowland et Arora (1997) le précisent dans le cas des plantes ligneuses, le niveau de dégradation des VSP serait aussi contrôlé par la demande des puits en azote (c'est-à-dire les nouvelles pousses lors de la reprise de croissance au printemps pour le peuplier ou la luzerne). Chez le colza, les puits étant absents, l'azote accumulé sous forme de VSP n'est alors pas utilisé.

**L'accumulation de la VSP dans le pivot et la hampe des plantes ayant subi l'ablation des organes reproducteurs est concomitante de la remobilisation des deux sous-unités de la RubisCO** (Figure V-7) **et d'une baisse de la répartition d'azote vers les feuilles (azote nouvellement absorbé ; Figure V-4 ou azote total)**. Ces faits tendent donc à montrer que la synthèse de VSP pourrait être déclenchée suite à la mobilisation de l'azote des feuilles sénescentes. C'est le cas pour le soja où l'expression des transcrits des VSP de 27 et 29 kDa augmente après la

maturation des graines (Staswick, 1989) et apparaît donc au cours du déroulement normal de la sénescence.

Les VSP permettraient alors le stockage provisoire d'azote tant que les organes puits présentent une demande limitée et/ou suite à une dégradation massive de protéines telles que la RubisCO lors de la sénescence foliaire (Mira *et al.*, 2002). De plus, Sauter et Van Cleve (1991) en étudiant des peupliers où la sénescence des feuilles était induite de façon précoce par une attaque fongique, ont mis en évidence une corrélation entre la mise en réserve de protéines et la sénescence foliaire. Le niveau de sénescence et son implication dans la remobilisation de l'azote des feuilles arrivées à ce stade ultime de leur développement semblent également dépendre des relations source-puits (Hörtensteiner et Feller, 2002).

**Ce n'est que lorsque la plante achève son développement végétatif (vraisemblablement à l'issue du programme ontogénétique) que l'azote peut être mis en réserve sous forme de VSP en l'absence de tissus puits ou en cas de décalage temporel entre l'offre des feuilles encore riches en azote et prêtes à tomber (au moment de la floraison) et la demande en azote des graines, au cours de leur remplissage (fin du printemps-début de l'été) (Figure VI-2).**

- *Suppression de la hampe :*

**La suppression de la hampe au début de la montaison conduit à une augmentation de la biomasse du pivot (Figure V-1) et des teneurs en azote du pivot (d'un facteur 3 à la mi-Mai) et de la partie résiduelle de la hampe (Figure V-5). En revanche, ceci ne se traduit pas par une accumulation sous forme de VSP (Figure V-6B).**

Ces plantes décapitées au début de la montaison ont été après quelques semaines sous dominance du reste du couvert végétal et donc en compétition avec celles-ci pour l'acquisition de la lumière. De plus, les bourgeons apparaissant à l'aisselle des feuilles de la rosette subsistant après coupe, étaient éliminés au fur et à mesure de leur apparition afin de privilégier au maximum la mise en réserve d'azote au niveau souterrain. Nous pouvons donc supposer que ces plantes présentent une activité photosynthétique réduite qui va fortement limiter les capacités de réduction de l'azote minéral puis son incorporation dans les acides aminés. Une analyse des fractions biochimiques solubles (nitrates, acides aminés, peptides) devrait nous permettre de déterminer sous quelle forme préférentielle cet azote est accumulé. Cependant, nous avons mené une autre étude en conditions contrôlées (résultats non présentés) suite à une suppression de la hampe à un stade D2 (c'est-à-dire alors que la montaison et le développement des jeunes bourgeons étaient un peu plus avancé). Dans ce cas, la compétition entre plantes pour la lumière était moindre par rapport aux conditions de plein champ mais les jeunes bourgeons étaient éliminés également dès leur apparition. L'accumulation de la VSP de 23 kDa a pu être constatée 15 jours après l'ablation alors qu'elle n'était

pas encore détectable sur les plantes témoin. Ceci suggère donc une hypothèse alternative (l'intervention d'un signal hormonal, le MeJA) qui est développée ci-après dans le § II-D.

### **II-D- Facteurs de régulation de l'accumulation de la VSP**

Différents facteurs susceptibles d'induire l'accumulation des VSP (tels que la disponibilité en azote, l'héméroperiode courte, les basses températures, le déficit hydrique, les facteurs hormonaux...) ont été testés chez le colza (Rossato *et al.*, 2002a). Cette étude a montré que seuls deux facteurs hormonaux apportés de façon exogène augmentent l'accumulation de la VSP de 23 kDa : l'ABA (molécule impliquée entre autres dans les phénomènes de stress hydrique) en apport racinaire à 6,2  $\mu\text{M}$ , et le MeJA en apport racinaire ou foliaire à 10  $\mu\text{M}$ . Le MeJA ainsi que la blessure induisent l'expression des VSP chez le soja et l'arabette des dames (Staswick, 1990 ; 1992 ; Berger *et al.*, 1995). Nous pouvons dès lors nous interroger au sujet des résultats issus de nos expériences de suppression d'organes : les effets obtenus pourraient aussi résulter d'un effet blessure. Cependant, Crafts-Brandner et Egli (1987b) ont également étudié les relations source-puits en diminuant la taille des puits par suppression des siliques de façon manuelle ou bien non destructive (en appliquant des dispositifs limitant leur développement). Ces travaux rapportent que, quelle que soit la méthode utilisée, le niveau de sénescence foliaire est diminué de la même façon. Par conséquent, l'effet de l'ablation d'organes ne correspondrait vraisemblablement pas à un artefact causé par la blessure. De plus, chez le colza, l'induction de la VSP ne semble effectivement pas liée à la blessure puisque la piqûre mécanique des feuilles ou leur lacération n'ont pas d'effet sur son accumulation (Rossato *et al.*, 2002a).

Des études approfondissant le rôle de signal joué par le MeJA ont été entreprises (Rossato *et al.*, 2002a, b). Son effet sur la synthèse de la VSP se produit avec de grandes similitudes d'action sur les processus d'absorption et de sénescence observés en conditions naturelles pendant la floraison du colza. En effet, l'accumulation de la VSP suite à l'application de MeJA n'est pas liée à une plus grande absorption d'azote (puisque'elle est inhibée en moins de 6 heures par le MeJA) mais au recyclage préférentiel de l'azote endogène des feuilles sénescentes. Par ailleurs, He *et al.* (2002) ont montré que l'augmentation du niveau des JA jouait un rôle dans la programmation de la sénescence chez l'arabette des dames. Leur voie de biosynthèse dans les feuilles sénescentes serait relayée par des gènes différents de ceux impliqués dans celle des JA liés aux phénomènes de blessure et de défense (He *et al.* 2002). De plus, le MeJA est retrouvé en grande quantité dans les fleurs, les tissus reproducteurs et dans les zones de division cellulaires des plantules (Creelman et Mullet, 1995), et de manière générale, les JA sont plus abondants dans les organes en développement (Staswick, 1992).

Dès lors, l'ensemble des résultats de Rossato *et al.* (2002a, b) couplé à notre étude consécutive à la suppression de la hampe nous conduisent à retenir comme hypothèse que le **MeJA** pourrait constituer un **facteur de sénescence** qui interviendrait en tant que **molécule signal**. Il pourrait être **synthétisé dans les bourgeons et dans les inflorescences pendant la montaison, concomitante du développement des jeunes organes reproducteurs**. L'augmentation de la synthèse de MeJA dans la plante pourrait d'autre part, conduire à l'arrêt de l'absorption d'azote et au recyclage de l'azote des feuilles sénescentes qui s'accumule alors sous forme de VSP dans les organes végétatifs (Figure V-8). Ce "signal MeJA" pourrait donc intervenir lors **d'un stade précis de développement de la plante (en lien probable avec le programme ontogénétique)**. Cela pourrait expliquer qu'il soit inhibé lors de la suppression précoce de la hampe et des jeunes bourgeons qu'elle porte et qu'il n'intervienne que tardivement en cas de suppression des inflorescences et des siliques qui conduit dans un premier temps à une plus grande production de biomasse aérienne. Ce faisceau d'arguments ne pourrait être confirmé que par une démonstration claire de la synthèse de MeJA au sein de la plante même si cette hypothèse de régulation par le MeJA est toutefois confortée par les travaux récents de Mc Ewan et Macfarlane Smith (1998) qui ont mis en évidence chez le colza une volatilisation de composés dérivant probablement de la biosynthèse du MeJA (Figure VI-2).

Il faut en outre rappeler que la régulation de la synthèse de la VSP chez le colza, comme chez d'autres espèces, dépend probablement davantage d'un équilibre complexe entre différents facteurs endogènes plus qu'elle ne résulterait de l'action isolée d'un seul d'entre eux. Nous avons d'ailleurs évoqué au Chapitre I, § III-C-5-c des exemples de renforcement de l'action du MeJA par la présence de saccharose (Mason *et al.*, 1992) ou sa diminution en présence d'auxine (De Wald *et al.*, 1994) sur l'induction de la synthèse des VSP chez le soja.

Ainsi, chez le colza, notre étude démontre **l'accumulation de la VSP lorsque le développement des organes reproducteurs est limité**, l'allocation différentielle de l'azote vers les tissus végétatifs jouant le rôle d'organes "tampon" pourrait ainsi permettre de participer **au maintien des ressources azotées**. Habekotté (1993) suggérait qu'une meilleure valorisation des assimilats acquis avant la floraison par l'amélioration de la capacité de stockage d'azote et une augmentation de sa remobilisation pour le remplissage des graines pourrait permettre d'accroître le rendement. Dans ce contexte, la VSP en tant **que réserve azotée « tampon »** pourrait constituer un outil intéressant en tant qu'indicateur de l'initiation de sénescence foliaire massive et par conséquent être révélatrice du statut source-puits pour l'azote des organes, et en particulier être le reflet d'un potentiel de mise en réserve au sein des organes végétatifs.

***CHAPITRE VII : CONCLUSIONS GENERALES  
ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE***

---

---

## **CHAPITRE VII :**

### **CONCLUSIONS GENERALES**

### **ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE**

---

#### **I- CONCLUSIONS GENERALES**

Ce travail de thèse associé à de récents travaux réalisés au laboratoire révèle la complexité de la régulation de la synthèse de VSP chez la luzerne et le colza. Il apporte des éléments de réponse sur le rôle qui peut être attribué à ces protéines de réserves au sein de la plante. L'ensemble de ces résultats est ici resitué sous forme de conclusions générales et revient sur les critères de définition permettant de caractériser les VSP.

**Chez la luzerne**, parmi différents facteurs environnementaux et endogènes potentiellement impliqués dans la synthèse des **VSP du pivot**, nos résultats ont montré que **la durée de la longueur du jour est un facteur essentiel dont l'effet se manifeste à plusieurs niveaux :**

- l'application d'une héméropériode courte (ou de basses températures (5°C)) favorise le développement des parties racinaires et l'allocation préférentielle de l'azote vers ces organes souterrains. Cependant, seul le raccourcissement de la durée du jour induit l'accumulation des VSP (protéines et transcrits) dans le pivot.
  
- chez 2 variétés ayant des potentiels d'accumulation de VSP différents, un effet variétal a été mis en évidence en réponse aux jours courts en fonction de l'origine géographique de ces 2 variétés. Ce résultat traduit une possibilité d'adaptation des plantes afin d'optimiser le maintien des ressources azotées endogènes en fonction des contraintes environnementales.
  
- la perception du signal "jours courts" pourrait impliquer la participation du système phytochrome.
  
- certaines phytohormones interviennent dans la régulation du niveau de stockage des VSP. Ainsi, l'inhibition de la synthèse des VSP en réponse à l'application de GAs en conditions de jours courts et l'induction de l'accumulation des VSP suite à un apport d'ABA ou d'inhibiteurs de la voie de synthèse de GAs suggèrent que la balance hormonale ABA/GAs pourrait intervenir dans le processus de mise en réserve des VSP au niveau du pivot.

**L'accumulation de l'azote sous forme de VSP observée lors de la période automno-hivernale serait spécifiquement induite par le raccourcissement de l'héméro-période. Le signal "jours courts", potentiellement perçu au niveau foliaire par le système phytochrome, pourrait être relayé au sein de la plante par les modifications des équilibres hormonaux, en particulier le rapport entre ABA et GAs.**

Une application racinaire de MeJA privilégie la répartition de l'azote vers le pivot de luzerne et entraîne une accumulation de VSP au sein de cet organe. Des études récentes (Meuriot *et al.*, 2003b) ont montré que l'une des VSP, la protéine de 32 kDa, présentait une forte homologie de séquence avec la chitinase d'une légumineuse tropicale (*Sesbania rostrata*). De plus, cette VSP posséderait une activité chitinase *in vitro*. Le rôle des chitinases dans les mécanismes de défense contre les champignons pathogènes et les insectes est aujourd'hui couramment admis. Le fait que le MeJA soit capable d'induire la synthèse de VSP en stimulant plus spécifiquement la synthèse de la VSP de 32 kDa suggère donc qu'en plus de son rôle de réserve transitoire d'azote, la VSP de 32 kDa pourrait également présenter des propriétés de protéines induites lors d'attaque de pathogènes (PR protein) (cf Chapitre VI, § I-E). L'ensemble de ces résultats fournit un faisceau d'arguments suggérant que **les VSP de la luzerne pourraient être impliquées dans la protection des plantes contre des stress abiotiques (tels que les basses températures) et biotiques (attaque par des pathogènes)**. Ce constat n'est pas surprenant car, ainsi que nous l'avons évoqué au cours de cette étude (cf Chapitre I, § III-B-2), de nombreuses VSP se voient attribuer actuellement un rôle supplémentaire ou alternatif à celui de stockage transitoire d'azote. De façon plus générale, l'ensemble de nos travaux suggère que **les VSP de la luzerne pourraient contribuer au maintien de la pérennité de cette espèce à la fois par leur fonction de stockage transitoire de l'azote et leur rôle potentiel dans la survie hivernale et dans la protection contre des agents pathogènes.**

Nos travaux ont également révélé chez la luzerne que l'induction du stockage d'azote sous forme de VSP (notamment par les jours courts) pouvait résulter de changements des relations entre organe source et puits pour l'azote conduisant à une modification de la répartition de cet élément entre organes.

La deuxième partie de notre travail a porté sur la **régulation de l'accumulation de la VSP de 23 kDa du colza en relation avec les modifications des relations source-puits**. Différents organes source ou puits pour l'azote ont été supprimés afin d'analyser les répercussions sur le processus de mise en réserve.

Les travaux de Rossato *et al.* (2001 ; 2002a, b) ont montré que la synthèse de VSP, chez le colza apparaît associée aux phénomènes de sénescence foliaire. Nos résultats semblent aller dans

ce sens, même si de réelles corrélations restent à établir. En effet, l'accumulation de cette VSP est moindre après la suppression de la moitié des feuilles de la rosette, lesquelles constituent des organes source importants. L'allocation d'azote vers les feuilles est alors plus importante et se maintient plus longtemps : ces ablations aboutissent à une diminution de la quantité de siliques lors de la récolte finale. De plus, la suppression des organes puits reproducteurs (inflorescences et siliques), qui dans un premier temps induit une augmentation de la biomasse aérienne avant que l'azote ne soit ensuite fortement alloué vers le pivot et la hampe, entraîne une accumulation de la VSP qui est tardive et massive au sein du pivot (et dans une moindre mesure dans la hampe). En outre, son accumulation fait suite à une augmentation de l'allocation d'azote vers les organes végétatifs alors que dans le même temps, le pourcentage d'azote attribué aux feuilles est diminué et que leur biomasse chute. Elle serait donc concomitante du passage de la plante **du stade végétatif au stade reproducteur, simultanément à la mise en place du processus de sénescence foliaire. Elle pourrait par sa remobilisation, constituer un marqueur de la transition du statut de puits à source des organes où elle est accumulée puis hydrolysée.** La VSP du colza pourrait donc avoir **un rôle qualitatif.**

Une partie de ce travail de thèse et différentes données rapportées par de nombreux travaux réalisés ces dernières années soulèvent le problème des critères de définition des VSP établies par Staswick (1994) (cf Chapitre I, § III-A-1), de son évolution et de ses limites.

Les résultats de cette étude ainsi que de nombreux travaux réalisés sur les VSP permettent donc d'envisager une réactualisation des caractéristiques de telles protéines :

- elles sont accumulées lors de phases où l'offre en azote dépasse la demande pour la croissance et le développement ou pour prévenir les conséquences de contraintes environnementales (froid, raccourcissement de la durée du jour, défoliation) ou biotiques (champignons, bactéries, insectes), autrement dit, leur accumulation est régie par l'ontogenèse et varie selon les contraintes externes.
- elles permettent une sauvegarde transitoire de l'azote pour une ré-utilisation ultérieure lorsque les conditions redeviennent favorables au développement et à la croissance.
- le rôle de stockage n'est cependant pas strict et il n'exclut pas une fonction alternative (résiduelle ou avérée) selon le tissu où elles sont mises en réserve et la contrainte rencontrée.

Ainsi, comme le suggèrent Rowland et Arora (1997), les VSP pourraient en réalité appartenir à une famille plus large de protéines de réserve et certaines d'entre elles, en plus de leur fonction de stockage d'azote, pourraient jouer un autre rôle dans l'acclimatation au froid ou la résistance aux pathogènes comme cela est suggéré par notre étude réalisée chez la luzerne. Ourry *et al.* (2001) suggèrent que les VSP auraient été vraisemblablement sélectionnées au cours

de l'évolution sans contrainte sévère consécutivement à une accumulation de mutations sur leur fonction enzymatique initiale qui seraient sans conséquence létale pour le développement de la plante. Toutefois, il faut également envisager que des enzymes puissent avoir perdu leur activité du fait d'un adressage dans un compartiment cellulaire (tel que la vacuole) qui diffère de leur lieu de fonctionnement habituel. Elles seraient ainsi devenues des protéines de réserve du fait de leur accumulation dans des tissus spécialisés dans le stockage.

De plus, à l'inverse d'autres formes de réserve (nitrate, acides aminés), ce stockage privilégié sous forme de protéines permettrait un maintien de l'équilibre osmotique des tissus et pourrait constituer un moyen indirect de réguler les capacités d'acquisition et de réduction de l'azote minéral.

Enfin, chez certaines plantes (colza, pêcher), elles ne représentent pas un pool majeur ni pour le taux de stockage ni pour la quantité d'azote libéré suite à leur mobilisation. Néanmoins, l'évolution de leur cycle accumulation/dégradation préférentiel serait révélatrice du statut azoté de la plante. Cela leur conférerait un rôle qualitatif et une utilisation possible en tant qu'indicateur.

## **II- PERSPECTIVES DE RECHERCHE**

Dans le prolongement des résultats et des discussions présentées précédemment, plusieurs perspectives de recherche peuvent être proposées sur le plan agronomique, physiologique et moléculaire.

### **II-A- Mise en réserve d'azote et mobilisation vers les tissus en développement**

Chez le **colza**, une meilleure connaissance de l'évolution des relations source-puits pour l'azote au cours du cycle pourrait permettre une avancée vers l'optimisation du remplissage des tissus reproducteurs tout en minimisant le contenu résiduel en azote des feuilles sénescents. Or, les compartiments "**tampon**" (**pivot et hampe**) semblent constituer **un bon moyen de détourner l'azote**. La détermination de **l'importance de leur contribution pour le remplissage des siliques via l'étude de l'accumulation de la VSP de 23 kDa qui pourrait en constituer le marqueur** présente alors un intérêt majeur.

- ✓ L'impact des bouleversements des relations source-puits par suppression d'organes sur l'accumulation de VSP devra tout d'abord être approfondi en intégrant l'ensemble du pool de feuilles mortes de façon continue tout au long du cycle. Ainsi, le **bilan complet des transferts d'azote** entre les organes permettrait de valider la relation de cause à effet supposée **entre le vidage des feuilles en azote et sa mise en réserve sous forme de VSP dans les organes pérennes**. Pour cela, l'ablation des organes devra se faire à différents degrés (élimination totale ou partielle) afin d'obtenir une quantité variable de tissus sénescents et établir un lien de proportionnalité entre les quantités d'azote remobilisé après recyclage foliaire et le niveau d'accumulation de la VSP.
- ✓ Par ailleurs, l'étude de l'augmentation du potentiel puits des siliques exprimé en mg d'azote. graine<sup>-1</sup>. jour<sup>-1</sup> en fonction des variations du potentiel source des feuilles pourrait permettre de vérifier **si la période d'accumulation de la VSP correspond à la limitation de la demande des organes reproducteurs** permettant alors à l'azote excédentaire d'être mis en réserve.
- ✓ D'autre part, il importerait d'étudier des plantes ayant subi **l'ablation des inflorescences ou des siliques de façon ponctuelle** et d'analyser les conséquences d'un développement accru de ramifications et du décalage consécutif de la mise en réserve au niveau des organes végétatifs sur le rendement lorsqu'elles mènent leur cycle ontogénétique jusqu'à terme. Une telle approche permettrait de **déterminer** :
  - les conditions **favorables à la mise en réserve et à la mobilisation ultérieure** (en terme de démarrage, de durée et d'efficacité du détournement de l'azote des feuilles),

- les mécanismes que développe la plante lorsqu'elle est soumise à une ablation de ses organes reproducteurs par des contraintes climatiques telles que le gel ou la sécheresse et ainsi permettre d'en évaluer l'impact sur le rendement final.

- ✓ L'étude concernant la VSP doit être resituée dans l'ensemble des processus de stockage transitoire par une analyse des différentes fractions azotées et de leur niveau d'implication afin de **connaître sa contribution dans le temps par rapport à l'ensemble des pools azotés** (notamment acides aminés et nitrate), ce qui permettrait de déterminer la fiabilité de cet indicateur potentiel.

Chez la **luzerne**, il est maintenant bien établi que les VSP ont un rôle quantitatif significatif dans la mise en réserve d'azote. Cependant, **leur niveau de contribution pour l'acquisition de la tolérance accrue à la défoliation et le maintien de la pérennité mériterait d'être évalué plus précisément**. Par exemple, l'étude de l'impact de coupes automnales tardives sur le niveau de réserve en VSP de différents cultivars et ses conséquences sur la reprise de croissance à la sortie de l'hiver présente un intérêt agronomique de premier ordre et fait d'ailleurs l'objet d'une collaboration entre l'UMR INRA-UCBN 950 EVA, l'équipe du Professeur J.J. Volenec du département d'Agronomie de l'Université de Purdue et l'équipe du Professeur Y. Castonguay d'Agriculture Canada de Québec.

### **II-B- Signaux impliqués dans l'induction des VSP**

Chez la **luzerne**, il est nécessaire d'approfondir l'étude des signaux régulateurs de l'accumulation de VSP.

- ✓ Pour confirmer les hypothèses concernant la **voie de transduction du signal "jours courts"**, il sera nécessaire :
  - de confirmer l'implication du système **phytochrome** en distinguant le rôle des différentes longueurs d'ondes de la lumière rouge (par une étude complémentaire sur **l'effet des conditions de jours courts en présence de flash rouge clair suivi d'une application d'un flash rouge sombre**).
  - de resituer cette étude dans le contexte plus large des phénomènes de compétition pour l'acquisition de la lumière dans un peuplement dense. Des plantes occupant une position dominante dans le couvert présentent une plus forte accumulation de VSP, qui peut être expliquée par les différences d'intensité lumineuse reçues par les plantes (Avice *et al.*, 1997b). Outre l'aspect quantitatif, notre approche montre **l'influence de la qualité de la lumière** sur la répartition et le stockage d'azote. Ce facteur constitue donc un paramètre important d'un point de vue agronomique, en intervenant notamment dans les effets

d'ombrage existant dans une culture dense. L'analyse des effets de modifications spectrales de la lumière pourrait permettre de mieux comprendre l'impact de la densité d'une luzerne sur la mise en réserve d'azote.

- ✓ Afin de déterminer l'implication réelle de la réduction de l'héméropériode et de l'abaissement des températures dans la mise en réserve d'azote, il faudra étudier l'effet d'une **acclimatation les plantes aux variations de la longueur du jour et de la température** en imposant des diminutions progressives et régulières se rapprochant davantage des conditions naturelles de la période automno-hivernale.
- ✓ Pour vérifier le rôle de relais que joueraient certaines **phytohormones (GAs, ABA)** dans le processus d'induction de la synthèse de VSP de luzerne par les jours courts, il paraît souhaitable d'effectuer des **dosages** sur des plantes placées dans différentes conditions d'héméropériode. Enfin, une approche moléculaire par l'analyse des zones promotrices des gènes codant les VSP pourrait permettre la **caractérisation d'éventuelles séquences régulatrices** impliquant entre autres les GAs, l'ABA ou le MeJA chez la luzerne, permettant de démontrer le rôle direct de ces molécules sur l'induction des gènes de VSP.

De la même façon, chez le **colza**,

- ✓ l'hypothèse du rôle de signal joué par le MeJA capable d'induire la sénescence foliaire et la synthèse de la VSP du colza, ne pourra être validée que par la **quantification de cette phytohormone *in situ*** en conditions de plein champ au cours du cycle de développement. Pour cela, une collaboration a d'ores et déjà été entreprise entre l'UMR INRA-UCBN 950 EVA et l'équipe du Pr I. Baldwin du Max Planck Institute for Chemical Ecology (Allemagne). Cependant, les conditions de piégeage adéquates restent à déterminer pour obtenir un dosage de cette molécule volatile.
- ✓ une approche moléculaire du même type que chez la luzerne pourrait être engagée chez le colza. Toutefois, le gène de la VSP de 23 kDa n'est pas isolé à ce jour. Des travaux concernant **l'obtention de la sonde ADNc** lui correspondant sont actuellement en cours au sein du laboratoire, elle constituerait alors un outil précieux pour étudier la régulation au niveau transcriptionnel de l'expression de cette protéine.

### **II-C- Autres rôles des VSP**

L'homologie de séquence de l'une **des VSP de la luzerne (32 kDa)** avec une **chitinase** suggère son implication potentielle dans les mécanismes de défense de la plante contre l'attaque de pathogènes. Par ailleurs, la synthèse de cette VSP pourrait être induite plus favorablement

chez des cultivars endurcis au froid, alors que les jours courts, facteur principal de la régulation de la synthèse des VSP ont également un rôle central dans l'acclimatation au froid (en interaction avec les basses températures). Cependant, **un lien réel entre son accumulation et le processus de défense ou l'acquisition de la tolérance au froid devrait être établi.**

Pour cela, il serait judicieux :

- ✓ d'étudier directement **l'effet de la blessure et de l'attaque de pathogènes** sur l'accumulation des VSP en particulier la VSP de 32 kDa et de caractériser l'activité chitinase potentielle. L'application exogène des phytohormones potentiellement impliquées dans la réponse aux pathogènes ou à la blessure (ABA, MeJA) pourrait permettre, par l'induction des VSP, de voir si leur niveau d'accumulation **contribue aux processus de résistance aux attaques biotiques.**
- ✓ de préciser le rôle de la VSP de 32 kDa dont l'homologie avec des chitinases pourrait suggérer une intervention dans le processus de protection contre le gel. Elle devra être étudiée chez des génotypes présentant des niveaux contrastés de capacité d'accumulation des VSP ou de tolérance au froid.
- ✓ de déterminer l'existence d'une variabilité génétique de l'accumulation des VSP en réponse aux jours courts chez des variétés d'origine géographique différente. A plus long terme, l'ensemble de ces caractéristiques devra être resitué de façon plus globale pour permettre d'établir le **lien entre accumulation de VSP, tolérance au stress, productivité et maintien de la pérennité.**

**Chez le colza**, les études sont moins avancées concernant l'existence d'une quelconque fonction annexe pour la VSP de 23 kDa. Cependant, des analyses permettant une telle caractérisation sont également envisageables. Dès lors, des informations supplémentaires sur la séquence protéique pourraient éventuellement permettre d'établir des **homologies avec d'autres protéines ayant des fonctions connues** et d'autre part apporter des renseignements sur la richesse particulière en certains acides aminés. Sous réserve que le dosage *in situ* du MeJA donne les résultats escomptés, une des pistes qu'il serait par exemple intéressant de suivre concernerait **l'implication potentielle d'une volatilisation du MeJA dans les mécanismes de défense** suite à une infestation par des insectes phytophages. Berger *et al.* (2002) ont ainsi observé que chez l'arabette des dames, le contact avec les sécrétions buccales d'insectes conduit à une induction préférentielle des transcrits de l'une des 2 VSP. D'autre part, le même traitement ainsi que l'application de JA ont des effets semblables sur le promoteur d'une des VSP du soja. Dès lors, l'hypothèse d'une synthèse de la VSP du colza contribuant comme chez l'arabette des dames à la réponse locale de défense des plantes face à une attaque d'insecte pourrait être testée.

Ce travail de thèse a contribué à faire progresser nos connaissances sur les conditions d'accumulation et de mobilisation des VSP chez la luzerne et le colza. Cependant, de nombreuses interrogations subsistent quant aux bénéfices écophysiologicals de la synthèse de ces protéines particulières. Leur importance réelle ne peut être connue que si les acquis sur leur régulation sont resitués dans l'ensemble des processus physiologiques et moléculaires du stockage d'azote et ouvre donc encore bon nombre de pistes de recherche.

***CHAPITRE VIII : VALORISATION DES COMPETENCES :  
UN NOUVEAU CHAPITRE DE THESE***

---

---

**CHAPITRE VIII :**

**VALORISATION DES COMPETENCES : UN NOUVEAU  
CHAPITRE DE THESE**

---

---

**Mise en réserve d'azote sous forme de protéines de réserve des organes végétatifs (VSP) chez *Medicago sativa* L. et *Brassica napus* L. : principaux facteurs de régulation**

**Carine Noquet**

**Ecole doctorale : Vie Agro Santé, Rennes**

**"Mentor" : Jean Marie Fétrot**

**Soutenance le 9 Décembre 2003**

## **I- CADRE GENERAL ET ENJEUX DE LA THESE**

Ce travail de thèse a permis de mener une étude chez deux espèces végétales cultivées : la luzerne et le colza, concernant la gestion intrinsèque de l'azote au cours du développement végétal. L'étude porte sur les interactions physiologiques qui s'établissent pour l'azote entre son prélèvement dans le sol, sa mise en réserve transitoire sous forme protéique et son utilisation pour la croissance ou le remplissage des grains.

Les enjeux sont de plusieurs ordres. Tout d'abord, d'un point de vue scientifique, les études menées contribuent à la compréhension du rôle de l'azote mis en réserve au cours du cycle de développement et l'incidence de sa mobilisation vers les organes en croissance. Ceci pourrait alors aider à une meilleure gestion des apports azotés (fertilisation) par les agriculteurs. Sur le plan économique, ceci entraînerait une diminution des coûts tout en améliorant le rendement et la qualité du fourrage. Par ailleurs, une connaissance plus approfondie des mécanismes relatifs à l'azote au sein de la plante pourrait favoriser une baisse sensible de la pollution par lixiviation (processus responsable de l'entraînement vers les nappes de substances dissoutes par mouvement de la phase liquide du sol) des nitrates. Ainsi, les résultats attendus de cette étude peuvent permettre l'amélioration de l'efficacité de l'utilisation de l'azote par la plante *via*, entre autres, une augmentation de la valeur nutritive des parties récoltées notamment pour l'alimentation animale (fourrage de luzerne ou tourteaux de colza).

L'UMR INRA-UCBN 950 EVA de CAEN qui m'a accueillie s'inclut dans un réseau scientifique en développant différents contrats parmi lesquels :

-Contrat région Basse-Normandie "Etude des potentiels cidricoles des principaux milieux naturels de production AOC en Basse-Normandie" 1999-2001, en partenariat avec la Préfecture du Calvados

-Contrat SOFRALAB "Caractérisation floristique des prairies permanentes de Basse-Normandie" 2002, en partenariat avec le ministère de l'Agriculture et de la Pêche

-Contrat SILEBAN "Propagation *in vitro* d'espèces légumières d'intérêt régional : optimisation de la micropropagation de la carotte en vue de constituer une banque de géotypes résistants au nématode *heterodera carotae*" en partenariat avec le SILEBAN

Cette thèse s'inclut plus précisément dans la thématique : "Nutrition et métabolisme de l'azote" développée parmi les différents thèmes de recherche du laboratoire avec pour objectif principal, l'étude intégrée de l'utilisation de l'azote chez les plantes cultivées.

L'équipe "azote" participe plus particulièrement à plusieurs projets :

-Contrat de plan état région "Espèces Végétales Prairiales" : "Nutrition et métabolisme azoté des espèces prairiales" 2000-2006, en partenariat avec le domaine INRA du Pin

-Action Incitative sur Programme INRA AIP Ecogène "Intégration des mécanismes contrôlant l'efficacité d'utilisation de l'azote : du gène à la population cultivée dans son environnement" 2001-2002, en partenariat avec l'UMR EGC Grignon et l'Unité de Nutrition Azotée des Plantes, Versailles

-Action azote financée par PROMOSOL (regroupement privé et public de la filière oléagineux) 2003-2005 en partenariat avec l'UMR EGC Grignon

Au sein du laboratoire qui m'a accueillie, les moyens scientifiques disponibles sont divers. Ainsi les orientations de l'UMR permettent, dans un premier temps, l'étude des mécanismes qui contrôlent la dynamique de croissance (repousse après défoliation ou élaboration de tissus reproducteurs) et conduisent à la répartition des assimilats azotés entre les différents organes. Par ailleurs, l'équipe s'intéresse à l'identification de facteurs impliqués dans la régulation de fonctions physiologiques clés telles que le stockage d'azote et la mobilisation de réserves. Enfin, le laboratoire développe des méthodes permettant l'étude depuis la plante entière (suivi de flux au sein de la plante) jusqu'au gène (étude moléculaire) au cours du cycle de culture, sur plante isolée ou sur une population. Ces moyens scientifiques ont permis l'élaboration d'expérimentations, à la fois en conditions contrôlées et de plein champ. Elles ont été conçues en collaboration avec l'ensemble de l'équipe de chercheurs et de techniciens affiliés à la thématique "azote" et ont fait l'objet de nombreuses discussions. En outre, j'ai pu bénéficier de l'ensemble de l'équipement disponible au laboratoire pour la mise en oeuvre de cette étude ainsi que du matériel informatique pour l'analyse et la mise en forme des résultats.

D'après les ressources globales du laboratoire, ramenées au nombre de personnes y travaillant : les moyens financiers mis à disposition pour ces expérimentations sur 4 années sont de l'ordre de 5,8 keuros. En ce qui concerne les moyens humains, une dizaine de personnes intervenant à différents niveaux et avec une durée variable (tout au long de la thèse ou de manière très ponctuelle) a été mobilisée. Elle constitue l'équipe encadrante (directeur de thèse, un maître de conférence, un chargé de recherche) et l'équipe technique (techniciens, autres stagiaires).

La thèse constitue un apprentissage sur plusieurs années de la gestion d'un projet depuis son élaboration jusqu'à son exploitation. La poursuite de ces études doctorales a représenté pour moi la possibilité de bénéficier d'une formation par la recherche dans le domaine végétal en lien avec l'agronomie. Cette opportunité s'est présentée à la suite de mon stage de DEA que j'ai pu réaliser en 1999 dans cette même unité de recherche et m'a permis de poursuivre de manière plus approfondie sur la même thématique.

Mon implication dans la définition et la programmation du projet s'est manifestée, dans un premier temps, par un travail de recherche et synthèse bibliographique, associée à un bilan des données obtenues au laboratoire préalablement au démarrage de la thèse. Par ailleurs, j'ai participé à

l'établissement d'un calendrier prévisionnel du déroulement des expérimentations et me suis pleinement investie dans l'organisation et la réalisation des expérimentations ainsi que dans l'analyse, l'exploitation et la mise en forme des résultats.

## **II- DEROULEMENT, GESTION ET COUT DU PROJET**

Le projet, fondé sur l'établissement d'hypothèses liées aux caractéristiques de développement et d'exploitation propres à la luzerne et au colza, vise à distinguer le mode de fonctionnement des 2 espèces. Il permet donc par l'obtention d'une partie de données exploitables directement, d'approfondir les connaissances sur les mécanismes considérés.

L'évaluation des facteurs de risques a été délicate du fait par exemple, de l'interdépendance des conditions climatiques et environnementales associées à la mise en place de l'expérimentation au champ et qui ne peuvent pas être maîtrisées. Dès lors, des expérimentations en conditions contrôlées étaient envisagées en concertation avec l'équipe encadrante, pour pallier à un éventuel échec du déroulement de la partie terrain.

En ce qui concerne les financements externes, un séjour de 3 mois au cours de la première année dans l'équipe américaine du Professeur Volenec (Département d'Agronomie, Purdue University, Indiana) avec laquelle l'UMR collabore depuis 1993, a nécessité une demande de financement auprès du bureau de la recherche (Université). Ce stage a permis l'acquisition d'un outil moléculaire nécessaire à la suite du déroulement du projet.

Par ailleurs, une partie des frais (concernant le fonctionnement général) occasionnés par ce projet a pu être prise en charge de façon plus large, notamment par le biais de programmes de recherche financés par l'INRA.

Au cours de ces 4 années, la définition précise du sujet ainsi que chaque étape de l'avancement du projet ont été discutées avec mon responsable de thèse, Alain Ourry (PR 1) et un maître de conférences développant au laboratoire la thématique abordée dans cette thèse (Jean-Christophe Avicé). Ces deux personnes m'ont guidé pour le choix des expérimentations et la façon de les exploiter tout en me laissant assumer l'entière responsabilité des décisions prises. La périodicité de réunions était déterminée en fonction de mes besoins et de la disponibilité de ces deux encadrants. De manière plus générale, ce travail a fait l'objet de présentations de résultats 2 fois par an devant les 15 personnes (soit environ 1/3 du personnel de l'unité) constituant l'équipe "azote". En dehors du laboratoire, les relations entretenues avec l'équipe américaine perdurent *via* la rédaction de publications communes.

En dehors de mes deux encadrants directs, ce projet a mobilisé de façon plus ou moins ponctuelle, une chargée de recherche, différents techniciens et membres du personnel administratif ainsi que d'autres stagiaires de thèse, DEA ou étudiants bénévoles (en Maîtrise ou Licence).

Mon allocation de recherche, attribuée par le Ministère de la Recherche, associée à un contrat de monitrice entrent dans la masse salariale à hauteur de 44 keuros ; par ailleurs, j'ai également pu bénéficier d'un contrat en 1/2 poste ATER pendant 10 mois cette dernière année pour lequel 11 keuros m'ont été versés. L'ensemble de ce financement correspond globalement à 75 % du temps consacré au projet pendant les 4 années.

Les coûts salariaux (en keuros, hors charges) des différentes personnes affiliées à ce projet en fonction du temps passé sont estimés de la manière suivante :

- directeur de thèse (Professeur) : 28,8 (contribuant à 5 % du temps total passé)
- maître de conférence : 37,5 (13 %)
- chargé de recherche : 5,1
- techniciens : 8,4
- personnel administratif : 2,3

Le temps passé par ces 3 dernières catégories au projet étant globalement estimé à 7 % de la durée totale.

Les dépenses relatives au matériel s'élèvent à 9,6 keuros. Les prestations internes pour notamment l'utilisation de gros équipement tels que le spectromètre de masse représentent un coût de 20 keuros (20 euros/ échantillon).

Parmi les prestations externes, le coût global concerne des déplacements notamment pour le stage effectué aux Etats-Unis (2,25 keuros) et la participation à un congrès international sur le colza à Copenhague (1,2 keuros) financés par l'Université.

### **III- COMPETENCES, SAVOIR FAIRE, QUALITES PROFESSIONNELLES ET PERSONNELLES**

Ce projet m'a permis de développer et d'acquérir un certain nombre de connaissances. Tout d'abord, sur le plan scientifique, par une utilisation des acquis de mes années d'études ainsi que des résultats précédemment obtenus au sein du laboratoire. Ainsi, dans un premier temps, il s'agissait de réaliser une synthèse des données disponibles dans la bibliographie sur le sujet sur luzerne et colza ainsi que sur d'autres plantes. Le travail initial de synthèse ainsi entrepris a permis d'établir un lien entre la bibliographie et les compétences du laboratoire afin de concevoir le programme d'expérimentations en un temps déterminé et à *posteriori* de vérifier la validité des études entreprises et des résultats acquis.

Par ailleurs, la mise en place des protocoles en fonction des coûts et des contraintes humaines (temps, domaine de compétence de l'équipe d'accueil) m'a permis d'élargir mes connaissances sur

un plan plus technique ainsi que de m'initier à certaines compétences analytiques développées dans le laboratoire (en biochimie, biologie moléculaire et spectrométrie de masse). Le travail en équipe, les discussions, ainsi que la sollicitation des personnes les plus compétentes dans les différents domaines ont également contribué à enrichir ma formation.

J'ai également pu développer mes connaissances dans d'autres domaines. Par exemple, l'utilisation de l'informatique a été nécessaire pour l'exploitation et le traitement des données ainsi que la rédaction de synthèses de résultats et la mise en forme pour des présentations, en français et en anglais. Par ailleurs, j'ai participé à la gestion des stocks nécessaires aux analyses (commande de produits chimiques et consommables).

En ce qui concerne plus particulièrement la conduite de projet, mon investissement s'illustre *via* la mise en place d'une expérimentation au champ, par des contacts réguliers de l'équipe avec l'agriculteur pour disposer d'une de ses parcelles (présentation de notre travail, de nos intérêts et besoins pour s'intégrer en parallèle avec son travail). Ceci s'est mis en place selon les données recensées dans des travaux antérieurs sur d'autres espèces végétales et par d'autres équipes ainsi que sur le colza au sein même du laboratoire.

Sur le plan de la communication, ce travail s'est traduit par la rédaction de publications, la conception de posters ainsi que des interventions orales au niveau national (dans le cadre de réunions de travail pour les collaborations avec d'autres équipes de recherche) ou international. Par exemple, les résultats relatifs à la régulation de la mise en réserve d'azote chez la luzerne sous formes de protéines de réserve des organes végétatifs (ou VSP pour vegetative storage protein) ont été mis en forme dans 2 articles. Le premier concerne le criblage de différents facteurs au niveau interne ou dans le milieu environnemental, potentiellement impliqués dans l'accumulation des VSP. Le deuxième s'attarde plus précisément sur l'incidence de la longueur du jour par une comparaison de son effet sur 2 variétés de luzerne et s'attache à élucider la voie par laquelle ce mécanisme intervient. Cette étude chez la luzerne va jusqu'au niveau génique avec l'utilisation de 2 sondes moléculaires (l'obtention de l'une s'est faite au cours du stage dans l'équipe américaine du Professeur Volenec). Enfin, l'expérimentation au champ sur colza a fait l'objet d'un troisième article. Il s'agit d'une étude plus approfondie des relations entre les différents organes caractérisés comme "source" ou "puits" pour l'azote au cours du cycle de culture en lien avec l'accumulation de la VSP du colza. Ces derniers travaux ont également été présentés lors d'une communication orale dans la session Agronomie du 11<sup>ème</sup> congrès international sur le colza en Juillet 2003.

La méthodologie de travail a consisté à alterner de façon la plus efficace entre la réalisation des différentes étapes du projet (étude et suivi bibliographique, cultures, traitements expérimentaux, récoltes, analyses, exploitation et rédaction des résultats) et des heures d'enseignement à accomplir dans le cadre d'un contrat de monitrice (64h de travaux dirigés/an) puis d'un 1/2 poste ATER (80h

de travaux dirigés/an). A ceci, se sont ajoutées la participation aux stages de monitorat ainsi que la préparation des posters et des interventions en congrès. Un déroulement prévisionnel a donc été établi puis ajusté périodiquement en fonction des priorités et des contraintes temporelles.

Ainsi, la gestion du temps s'est faite par l'établissement d'un calendrier pour des compte-rendus réguliers de l'état d'avancement des travaux et des résultats. Ceci a nécessité une évaluation du temps nécessaire pour chaque étape. Par exemple, l'élaboration de chaque expérimentation devait tenir compte du temps de pré-culture ainsi que de la disponibilité de la salle de culture en conditions contrôlées ou de l'avancement de la végétation en conditions de plein champ. La suite du déroulement dépendait de la durée de l'expérimentation puis du temps nécessaire aux analyses, à l'exploitation et à l'expression des résultats afin de fournir un bilan régulier à l'équipe. Une fois l'estimation faite de tous les paramètres, je proposais donc des dates qui étaient discutées et validées avec mes encadrants et les autres intervenants impliqués.

J'ai également eu l'opportunité de développer un travail au sein d'une équipe grâce à des réunions avec les personnes concernées et estimées les plus compétentes pour poser des questions ou solliciter leur intervention sur des points méthodologiques ponctuels. L'organisation du déroulement des analyses et du partage des différents équipements entre les multiples utilisateurs a pu également s'établir suite à des discussions en équipe.

Pour la réalisation de ce projet, la répartition de mon temps d'intervention s'est faite entre la conception et la réalisation des expérimentations (50 % du temps total consacré), l'analyse des résultats, la rédaction des publications et du manuscrit (25 %) et l'enseignement (25%).

Au delà de l'aspect scientifique, la thèse fût une occasion de s'intéresser à des aspects plus variés. Ainsi, au point de vue administratif, j'ai eu des contacts avec certains services universitaires (bureau de la recherche, service des ressources humaines, école doctorale...). Par ailleurs, la rédaction de publications, posters, la préparation d'une communication orale pour un congrès international ainsi que les discussions avec l'équipe d'accueil américaine lors d'un déplacement de 3 mois aux USA au cours de la première année m'ont permis d'acquérir un niveau correct d'anglais.

De façon plus globale, ce travail m'a également permis de développer des capacités de communication : organiser et structurer une argumentation convaincante qui permette l'expression de mes idées tout en apprenant à s'adapter au public concerné en resituant ce travail dans un contexte plus général lorsque cela s'avérait nécessaire.

Le sujet de thèse que j'aborde propose une étude originale de la régulation de la mise en réserve d'azote sous forme de protéines spécifiques, jusqu'alors jamais entreprise sur la luzerne. D'autre part, il a permis de réaliser une synthèse du mode de fonctionnement de 2 modèles végétaux différents autour du même processus de mise en réserve. Au cours de ce projet, j'ai été confrontée au choix des hypothèses les plus judicieuses et des résultats les plus percutants pour la soumission

d'articles. Ces orientations ont été prises en fonction de la littérature et des exigences de la thématique relativement au département Environnement-Agronomie de l'INRA. Par ailleurs, j'ai dû mettre en oeuvre des capacités de synthèse pour la rédaction.

Ce travail a également nécessité une certaine adaptabilité dans différents domaines depuis la conception jusqu'à la présentation des résultats (entre le travail en serre, au champ, de paillasse, la synthèse et la rédaction). De plus, il s'est mis en place selon les contraintes temporelles et la disponibilité des personnes pour l'organisation du travail en équipe.

D'autre part, une certaine rigueur s'est imposée à différents stades. Elle s'est par exemple, manifestée par une réflexion avant démarrage des expérimentations, puis par un suivi régulier des cultures et des traitements appliqués aux plantes. Enfin, la vérification des données obtenues s'est faite *via* le contrôle des étapes par répétition des analyses, un traitement statistique des données ainsi que par un lien avec la littérature existante.

J'ai également eu le plaisir de pouvoir développer au sein d'une équipe, l'idée de complémentarité au service de la collectivité par une organisation de travail permettant le partage des tâches avec d'autres stagiaires et personnel technique du laboratoire. L'opportunité de faire de l'enseignement m'a permis de prendre la responsabilité d'étudiants pour les accompagner sur une durée donnée afin de transmettre des connaissances, et ainsi, de développer une certaine aptitude à l'organisation d'un groupe.

Ces différentes expériences m'ont permis de prendre confiance pour la prise de parole en public et d'étendre mon intérêt à un aspect pédagogique tout en bénéficiant de l'échange en équipe pour mener à bien un projet.

Enfin, cette thèse m'a permis de construire un réseau de connaissances avec différentes personnes. Tout d'abord, sur un plan personnel j'ai échangé avec d'autres thésards, des stagiaires du laboratoire ou de l'extérieur (lors de congrès, au cours de stages de monitorat). Puis, j'ai eu l'occasion d'élargir mes contacts sur un plan plus professionnel par le biais des collaborations entretenues par le laboratoire notamment avec l'équipe américaine du Professeur Volenec.

#### **IV- RESULTATS, IMPACT DE LA THESE**

Les retombées de ce travail de thèse se situent à différents niveaux.

Tout d'abord, pour le laboratoire, la validation scientifique par les publications dans le cadre du département Environnement-Agronomie permet de répondre aux demandes de l'INRA. De plus, d'autres perspectives de recherche peuvent être envisagées par l'équipe "azote" selon les résultats obtenus.

Pour la recherche, les publications reconnues au niveau international et une diffusion des résultats lors de congrès permettent une ouverture potentielle vers de nouvelles collaborations et un renforcement des collaborations actuelles.

A une échelle plus large, une avancée vers une meilleure gestion des coûts agricoles ainsi qu'une augmentation des rendements agricoles et de la qualité des fourrages peuvent être envisagées avec des retombées à plus ou moins long terme (*via* par exemple, une avancée sur les problèmes de pollution par la lixiviation des nitrates).

Enfin, sur un plan plus personnel et concernant un aspect professionnel, le développement de ce projet m'a permis de confirmer mon goût pour la recherche scientifique dans le domaine végétal et de découvrir un grand intérêt pour l'enseignement. C'est pourquoi j'ai posé ma candidature pour un poste ATER que j'ai obtenu à l'Université de Rennes en Physiologie Végétale pour la rentrée universitaire 2003-2004, à compter du 1<sup>er</sup> septembre 2003.

J'espère pouvoir ensuite poursuivre une carrière de chercheur dans un organisme public ou privé de recherche ou d'enseignant chercheur à l'Université en me présentant aux différents concours ou postes à pourvoir dans ce domaine. Dans un premier temps, il s'agira donc pour moi de poser ma candidature pour l'inscription sur la liste de qualification aux emplois de maîtres de conférences d'ici octobre 2003 pour envisager dans un second temps la possibilité de postuler aux emplois proposés par les établissements d'enseignement supérieur dès la campagne 2004. En fonction de cette première tentative, d'autres possibilités pourront être envisagées pour enrichir mon dossier telles que l'éventualité d'un séjour post-doctoral à l'étranger, mais pour l'instant aucune recherche concrète n'a été initiée.

Une fois ma thèse soutenue, j'envisage également de m'inscrire sur la liste de l'antenne locale de l'Université de Rennes I de l'association Bernard Grégory afin que mon CV soit ajouté à la banque de données que l'association met à la disponibilité des employeurs. Je n'ai cependant, à ce jour, pris aucun contact concret avec le secteur privé, je n'en ai en effet pas eu l'opportunité et n'ai pas pris le temps de m'y consacrer. Cependant, ce travail de thèse pourrait présenter un intérêt pour des domaines tels que l'agro-alimentaire en ce qui concerne la valorisation de l'azote pour améliorer la qualité du fourrage de luzerne ou du tourteau de colza (notamment dans le contexte actuel de son utilisation en substitution de farines animales). Cette étude peut également constituer une approche s'inscrivant dans le secteur de l'environnement avec une contribution potentielle à l'amélioration des programmes de gestion de la fertilisation azotée en fonction des acquis sur le mode de fonctionnement des plantes. Ceci peut permettre d'envisager la diminution des risques de pollution et peut également présenter un intérêt non négligeable sur le plan économique. Dès lors, une candidature spontanée dans le secteur de la recherche et développement de ce type d'entreprise peut être envisagée.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

---

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Améziane R, Richard-Molard C, Deléens E, Morot-Gaudry JF, Limami AM (1997) Nitrate ( $^{15}\text{NO}_3$ ) limitation affects nitrogen partitioning between metabolic and storage sinks and nitrogen reserve accumulation in chicory (*Cichorium intybus* L.). *Planta* **202**, 303-312.
- Andrews DL, Beames B, Summers MD, Park WD (1988) Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector. *Biochemical Journal* **252**, 199-206.
- Anderson JM (1988) Jasmonic acid-dependant increases in the level of specific polypeptides in soybean suspension cultures and seedlings. *Journal of Plant Growth Regulation* **7**, 203-211.
- Anderson JM (1991) Jasmonic acid - dependant increase in vegetative storage protein in soybean tissue cultures. *Journal of Plant Growth Regulation* **10**, 5-10.
- Arora R, Wisniewski ME, Scorza R (1992) Cold acclimation in genetically related (sibling) deciduous and evergreen peach (*Prunus persica* [L.] Batsch). *Plant Physiology* **99**, 1562-1568.
- Avice JC (1996) Mobilisation des réserves azotées et carbonées chez *Medicago sativa* L. : étude par marquage  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$ , caractérisation des protéines de réserve du pivot et relation avec le potentiel de repousse après une coupe. Thèse de Doctorat, Université de Caen, France, 135p.
- Avice JC, Ourry A, Volenec JJ, Lemaire G, Boucaud J (1996a) Defoliation-induced changes in abundance and immunolocalization of vegetative storage proteins in taproots of *Medicago sativa* L. *Plant Physiology and Biochemistry* **34**, 561-570.
- Avice JC, Ourry A, Lemaire G, Boucaud J (1996b) Nitrogen and carbon flows estimated by  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  pulse chase labelling during regrowth of alfalfa. *Plant Physiology* **112**, 281-290.
- Avice JC, Ourry A, Lemaire G, Volenec JJ, Boucaud J (1997a) Root protein and vegetative storage proteins are key organic nutrients for alfalfa shoot regrowth. *Crop Science* **37**, 1187-1193.
- Avice JC, Lemaire G, Ourry A, Boucaud J (1997b) Effects of the previous shoot removal frequency on subsequent shoot regrowth in two *Medicago sativa* L. cultivars. *Plant and Soil* **188**, 189-198.
- Avice JC, Noquet C, Ourry A, Volenec JJ (2001a) Effects of photoperiod, low temperature and N nutrition on VSP accumulation in taproot of alfalfa. In *Proceedings of XIX International Grassland Congress*, pp. 52-53.
- Avice JC, Louahia S, Kim TH, Jacquet A, Morvan-Bertrand A, Prud'Homme MP, Ourry A, Simon JC (2001b) Influence des réserves azotées et carbonées sur la repousse des espèces prairiales. *Fourrages* **165**, 3-22.
- Barber LD, Joern BC, Volenec JJ, Cunningham SM (1996) Supplemental nitrogen effects on alfalfa regrowth and nitrogen remobilization from roots. *Crop Science* **36**, 1217-1223.
- Beardmore T, Wetzell S, Kalous M (2000) Interactions of airborne methyl jasmonate with vegetative storage protein gene and protein accumulation and biomass partitioning in *Populus* plants. *Canadian Journal of Forest Research* **30**, 1106-1113.
- Berger S, Bell E, Sadka A, Mullet JE (1995) *Arabidopsis thaliana* atvsp is homologous to soybean *VspA* and *VspB*, genes encoding vegetative storage protein acid phosphatases, and is regulated

- similarly by methyl jasmonate, wounding, sugars, light and phosphate. *Plant Molecular Biology* **27**, 933-942.
- Berger S, Mitchell-Olds T, Stotz HU (2002) Local and differential control of vegetative storage protein expression in response to herbivore damage in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **114**, 85-91.
- Bewley JD (2002) Root storage proteins, with particular reference to taproots. *Canadian Journal of Botany* **80**, 321-329.
- Binnie SC, Grossnickle SC, Roberts DR (1994) Fall acclimation patterns of interior spruce seedlings and their relationship to changes in vegetative storage proteins. *Tree Physiology* **14**, 1107-1120.
- Black BL, Parmentier-Line CM, Fuchigami LH, Coleman GD (2001) Ecotypic and genetic variation in poplar bark storage protein gene expression and accumulation. *Tree Physiology* **21**, 1289-1297.
- Blake MS, Johnston KH, Russell-Jones GJ, Gotschlich EC (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase conjugated anti-antibody on western blots. *Analytical Biochemistry* **136**, 175-179.
- Bouchart V, Macduff JH, Ourry A, Svenning MM, Gay AP, Simon JC, Boucaud J (1998) Seasonal pattern of accumulation and effects of low temperatures on storage compounds in *Trifolium repens* L. *Physiologia Plantarum* **104**, 65-74.
- Boyce PJ, Volenec JJ (1992)  $\beta$ -amylase from taproots of alfalfa. *Phytochemistry* **31**, 427-431.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Buchanan-Wollaston V (1997) The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **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 Biotechnology Journal* **1**, 3-22.
- Bunker TW, Koetje DS, Stephenson LC, Creelman RA, Mullet JE, Grimes HD (1995) Sink limitation induces the expression of multiple soybean vegetative lipoxygenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid level remains low. *The Plant Cell* **7**, 1319-1331.
- Caillot S (2002) Induction du stockage d'azote sous forme de protéines de réserve (VSP) dans le pivot de la luzerne (*Medicago sativa* L.) par les jours courts et les phytohormones. Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies, Université de Caen, 31p.
- Chapin FS III, Kedrowski RA (1983) Seasonal changes in nitrogen and phosphorus fractions and autumn retranslocation in evergreen and deciduous taiga trees. *Ecology* **64**, 376-391.
- Chapin FS III, Schulez ED, Mooney HA (1990) The ecology and economics of storage plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **21**, 423-447.
- Clausen S, Apel K (1991) Seasonal changes in the concentration of the major storage protein and its mRNA in xylem ray cells of poplar trees. *Plant Molecular Biology* **17**, 669-678.
- Coleman GD, Chen THH, Ernst SG, Fichigami L (1991) Photoperiod control of poplar bark storage protein accumulation. *Plant Physiology* **96**, 686-692.

- Coleman GD, Chen THH, Fuchigami L (1992) Complementary DNA cloning of poplar bark storage protein and control of its expression by photoperiod. *Plant Physiology* **98**, 687-693.
- Coleman GD, Englert JM, Chen THH, Fuchigami LH (1993) Physiological and environmental requirements for poplar (*Populus deltoides*) bark storage protein degradation. *Plant Physiology* **102**, 53-59.
- Coleman GD, Banados MP, Chen THH (1994) Poplar bark storage protein and a related wound-induced gene are differentially induced by nitrogen. *Plant Physiology* **106**, 211-215.
- Corbel G, Robin C, Frankow-Lindberg BE, Ourry A, Guckert A (1999) Regrowth of white clover after chilling : assimilate partitioning and vegetative storage proteins. *Crop Science* **39**, 1756-1761.
- Corre N, Bouchart V, Ourry A, Boucaud J (1996) Mobilization of nitrogen reserves during regrowth of defoliated *Trifolium repens* L. and identification of potential vegetative storage proteins. *Journal of Experimental Botany* **47**, 1111-1118.
- Côté B, Dawson JO (1986) Autumnal changes in total nitrogen, salt-extractable proteins and amino acids in leaves and adjacent bark of black alder, eastern cottonwood and white basswood. *Physiologia Plantarum* **67**, 102-108.
- Couture L, Dhont C, Chalifour FP, Drapeau R, Tremblay G, Castonguay Y, Bélanger G, Nadeau P (2002) *Fusarium* root and crown rot in alfalfa subjected to autumn harvests. *Canadian Journal of Plant Science* **82**, 621-624.
- Crafts-Brandner SJ, Egli DB (1987a) Sink removal and leaf senescence in soybean. *Plant Physiology* **85**, 662-666.
- Crafts-Brandner SJ, Egli DB (1987b) Modification of seed growth in soybean by physical restraint : effect on leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **38**, 2043-2049.
- Crawford TW, Rending VV, Broadbent FE (1982) Source, fluxes and sinks of nitrogen during early reproductive growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiology* **70**, 1654-1660.
- Creelman RA, Mullet JE (1995) Jasmonic acid distribution and action in plants : regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**, 4114-4119.
- Creelman RA, Mullet JE (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 355-381.
- Culvenor RA, Davidson IA, Simpson RJ (1989) Regrowth by swards of subterranean clover after defoliation. 1- Growth, non-structural carbohydrate and nitrogen content. *Annals of Botany* **64**, 545-556.
- Cunningham SM, Volenec JJ (1996) Purification and characterization of vegetative storage proteins from alfalfa (*Medicago sativa* L.) taproots. *Journal of Plant Physiology* **147**, 625-632.
- Cunningham SM, Volenec JJ (1998) Seasonal carbohydrate and nitrogen metabolism in roots of contrasting alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars. *Journal of Plant Physiology* **153**, 220-225.
- Cyr DR, Bewley JD (1990a) Seasonal variation in nitrogen storage reserves in the roots of leafy spurge (*Euphorbia esula*) and responses to decapitation and defoliation. *Physiologia Plantarum* **78**, 361-366.

- Cyr DR, Bewley JD (1990b) Proteins in the roots of the perennial weeds chicory (*Cichorium intybus* L.) and dandelion (*Taraxacum officinale* Weber) are associated with overwintering. *Planta* **182**, 370-374.
- D**amerval C, Devienne D, Zivy M, Tarroux P, Vincens P (1993) L'électrophorèse bidimensionnelle des protéines. *Biofutur* **123**, 3-18.
- Davidson IA, Culvenor RA, Simpson RJ (1990) Effects of previous defoliation regime and mineral nitrogen on regrowth in white clover swards : photosynthesis, respiration, nitrogenase activity and growth. *Annals of Botany* **65**, 665-677.
- Davis JM, Egelkroun EE, Coleman GD, Chen THH, Haissig BE, Riemenschneider DE, Gordon MP (1993) A family of wound-induced genes in populus shares common features with genes encoding vegetative storage proteins. *Plant Molecular Biology* **23**, 135-143.
- Dejoux JF, Recous S, Meynard JM, Trinsoutrot I, Leterme P (2000) The fate of nitrogen from winter-frozen rapeseed leaves : mineralization, fluxes to the environment and uptake by rapeseed crop in spring. *Plant and Soil* **218**, 257-272.
- Denison RF, Hunt S, Layzell DB (1992) Nitrogenase activity, nodule respiration, and O<sub>2</sub> permeability following detopping of alfalfa and birdsfoot trefoil. *Plant Physiology* **98**, 894-900.
- De Wald DB, Mason HS, Mullet JE (1992) The soybean vegetative storage VSP  $\alpha$  and VSP  $\beta$  are acid phosphatases active on polyphosphates. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 15958-15964.
- De Wald DB, Sadka A, Mullet JE (1994) Sucrose modulation of soybean *Vsp* gene expression is inhibited by auxin. *Plant Physiology* **104**, 439-444.
- Dhont C, Castonguay Y, Nadeau P, Bélanger G, Chalifour FP (2002) Alfalfa root carbohydrates and regrowth potential in response to fall harvests. *Crop Science* **42**, 754-765.
- Dhont C, Castonguay Y, Nadeau P, Bélanger G, Chalifour FP (2003) Alfalfa root nitrogen reserves and regrowth potential in response to fall harvests. *Crop Science* **43**, 181-194.
- Dickson RE, Vogelmann TC, Larson PR (1985) Glutamine transfer from xylem to phloem and translocation to developing leaves of *Populus deltoides*. *Plant Physiology* **77**, 412-417.
- Diepenbrock W (2000) Yield analysis of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) : a review. *Field Crop Research* **67**, 35-49.
- Dreccer MF, Schapendonk AHCM, Slafer GA, Rabbinge R (2000) Comparative response of wheat and oilseed rape to nitrogen supply : absorption and utilisation efficiency of radiation and nitrogen during the reproductive stages determining yields. *Plant and Soil* **220**, 189-205.
- Dubbs WE, Grimes HD (2000) Specific lipoxygenase isoforms accumulate in distinct regions of soybean pod walls and mark a unique cell layer. *Plant Physiology* **123**, 1269-1279.
- F**armer EE, Ryan CA (1990). Interplant communication : airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **87**, 7713-7716.
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* **132**, 6-13.
- Fischer AM, Dubbs WE, Baker RA, Fuller MA, Stephenson LC, Grimes HD (1999) Protein dynamics, activity and cellular localization of soybean lipoxygenases indicate distinct functional roles for individual isoforms. *The Plant Journal* **19**, 543-554.

- Flores T, Alape-Girón A, Flores-Díaz M, Flores HE (2002) Ocatin : A novel tuber storage protein from the andean tuber crop oca with antibacterial and antifungal activities. *Plant Physiology* **128**, 1291-1302.
- Franceschi VR, Wittenbach VA, Giaquinta RT (1983) Paraveinal mesophyll of soybean leaves in relation to assimilate transfer and compartmentation. *Plant Physiology* **72**, 586-589.
- Franceschi VR, Grimes HD (1991) Induction of soybean vegetative storage proteins and anthocyanins by low-level atmospheric methyl jasmonate. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **88**, 6745-6749.
- Gabrielle B, Denoroy P, Gosse G, Justes E, Andersen MN (1998) A model of leaf area development and senescence of winter oilseed rape. *Field Crop Research* **57**, 209-222.
- Gana JA, Kalengamaliro NE, Cunningham SM, Volenec JJ (1998) Expression of  $\beta$ -amylase from alfalfa taproots. *Plant Physiology* **118**, 1495-1506.
- Gaudillère JP (1997) Gestion de l'azote chez les espèces ligneuses. In *Assimilation de l'azote chez les plantes: aspects physiologique, biochimique, moléculaire*. Ed JF Morot-Gaudry, Paris, INRA, pp. 295-305.
- Gomez L, Faurobert M (2002) Contribution of vegetative storage proteins to seasonal nitrogen variations in the young shoots of peach trees (*Prunus persica* L. Batsch). *Journal of Experimental Botany* **53**, 2431-2439.
- Goormachtig S, Lievens S, Van de Velde W, Van Montagu M, Holsters M (1998) Srchil 3, a novel early nodulin from *Sesbania rostrata*, is related to acidic class III chitinases. *The Plant Cell* **10**, 905-915.
- Gordon AJ, Ryle GJA, Mitchell DF, Lowry KH, Powell CE (1986) The effect of defoliation on carbohydrate, protein and leghemoglobin content of white clover nodules. *Annals of Botany* **58**, 149-154.
- Gordon AJ, Kessler W (1990) Defoliation induced stress in nodules of white clover. *Journal of Experimental Botany* **41**, 1255-1262.
- Goulas E (2001) Dynamique de repousse chez *Trifolium repens* L. (trèfle blanc) en relation avec la morphogenèse et l'azote protéique de réserve. Caractérisation physiologique et moléculaire des VSP. Thèse de Doctorat, Université de Caen, France, 147 p.
- Goulas E, Le Dily F, Teissedre L, Corbel G, Robin C, Ourry A (2001) Vegetative storage proteins in white clover (*Trifolium repens* L.) : quantitative and qualitative features. *Annals of Botany* **88**, 789-795.
- Greenwood JS, Stinissen HM, Peumans WJ, Chripeels M (1986) *Sambucus nigra* agglutinin is located in protein bodies in the phloem parenchyma of the bark. *Planta* **167**, 275-278.
- Habekotté B (1993) Quantitative analysis of pod formation, seed set and seed filling in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) under field conditions. *Field Crop Research* **35**, 21-33.
- Harms U, Sauter JJ (1991) Storage proteins in the wood of Taxodiaceae and of *Taxus*. *Journal of Plant Physiology* **138**, 497-499
- Harms U, Sauter JJ (1994) Biochemical and immunological investigations on vegetative storage proteins of *Taxodiaceae* species. *Journal of Plant Physiology* **143**, 601-608.
- Hartwig UA , Heim I, Luscher A (1994) The nitrogen-sink is involved in the regulation of nitrogenase activity in white clover after defoliation. *Physiologia Plantarum* **92**, 375-382.

- He Y, Fukushige H, Hildebrand DF, Gan S (2002) Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Physiology* **128**, 876-884.
- Hedden P (1999) Recent advances in gibberellin biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **50**, 553-563.
- Heilmeyer H, Monson RK (1994) Carbon and nitrogen storage in herbaceous plants. In *A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions*. Eds E Garnier et J Roy, SPB Academic publishing, The Hague, pp. 149-171.
- Hendershot KL, Volenec JJ (1993a) Taproot nitrogen accumulation and use in overwintering alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Journal of Plant Physiology* **141**, 68-74.
- Hendershot KL, Volenec JJ (1993b). Nitrogen pools in taproots of *Medicago sativa* L. after defoliation. *Journal of Plant Physiology* **141**, 129-135.
- Hocking PJ, Randall PJ, De Marco D (1997) The response of dryland canola to nitrogen fertilizer : partitioning and mobilization of dry matter and nitrogen, and nitrogen effects on yield components. *Field Crop Research* **54**, 201-220.
- Hodgkinson KC (1969) The utilization of root organic compounds during the regeneration of lucerne. *Australian Journal of Biological Sciences* **22**, 1113-1123.
- Hörtensteiner S, Feller U (2002) Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Botany* **53**, 927-937.
- Huang JF, Bantoch DJ, Greenwood JS, Staswick PE (1991) Methyl jasmonate treatment eliminates cell-specific expression of vegetative storage protein genes in soybean leaves. *Plant Physiology* **97**, 1512-1520.
- Jackson SD, (1999) Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. *Plant Physiology* **119**, 1-8.
- Junk GA, Svec MJ (1958) Nitrogen isotope abundance measurements. US Atom. Ener. Comm., Office of Technical Information ISC-1138.
- Justes E, Thiébeau P, Avice JC, Lemaire G, Volenec JJ, Ourry A (2002) Influence of summer sowing dates, N fertilization and irrigation on autumn VSP accumulation and dynamics of spring regrowth in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* **53**, 111-121.
- Kalengamaliro NE, Volenec JJ, Cunningham SM, Joern BC (1997) Seedling development and deposition of starch and storage proteins in alfalfa roots. *Crop Science* **37**, 1194-1200.
- Kang S, Titus JS (1980) Quantitative and qualitative changes in nitrogenous compounds in senescing leaf and bark tissues of apple. *Physiologia Plantarum* **50**, 285-290.
- Kato T, Shirano Y, Iwamoto H, Shibata D (1993) Soybean lipoxygenase l-4, a component of the 94-kilodalton storage protein in vegetative tissues : expression and accumulation in leaves induced by pod removal and by methyl jasmonate. *Plant Cell and Physiology* **34**, 1063-1072.
- Khoudi H, Laberge S, Ferullo JM, Bazin R, Darveau A, Castonguay Y, Allard G, Lemieux R, Vezina LP (1999) Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Biotechnology and Bioengineering* **64**, 135-143.
- Kim TH, Ourry A, Boucaud J, Lemaire G (1991) Changes in source-sink relationship for nitrogen during regrowth of lucerne (*Medicago sativa* L.) following removal of shoots. *Australian Journal of Plant Physiology* **18**, 593-602.

- Kim TH, Ourry A, Boucaud J, Lemaire G (1993a) Partitioning of nitrogen derived from N<sub>2</sub> fixation and reserves in nodulated *Medicago sativa* L. during regrowth. *Journal of Experimental Botany* **44**, 555-562.
- Kim TH, Bigot J, Ourry A, Boucaud J (1993b) Amino acid contents of xylem sap of regrowing lucerne (*Medicago sativa* L.) : relations with N uptake, N<sub>2</sub> fixation and reserves remobilization. *Plant and Soil* **149**, 167-174.
- Koda (1997) Possible involvement of jasmonates in various morphogenic events. *Physiologia Plantarum* **100**, 639-646.
- Kullmann A, Geisler G (1986) Translocation of labelled nitrogen in oilseed rape. In *Fundamental, ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants*. Eds H Lambers, JJ Neeteson et I. Stulen, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht/Boston/Lancaster, Pays-Bas. pp. 127-129.
- Kwon HB, Na JG (2001) Induction of the expression of vegetative storage protein (VSP) genes in response to gibberellins in the *ga* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Korean Journal of Genetics* **23**, 233-240.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Langheinrich U, Tischner R (1991) Vegetative storage protein in poplar: induction and characterization of a 32 and a 36 kD polypeptide. *Plant Physiology* **97**, 1017-1025.
- Langheinrich U (1993) Clonal variation in apical growth and content in vegetative storage proteins in *Populus*. *Trees* **7**, 242-249.
- Lawrence SD, Greenwood JS, Korhnak TE, Davis JM (1997) A vegetative storage protein homolog is expressed in the growing shoot apex of hybrid poplar. *Planta* **203**, 237-244.
- Lawrence SD, Cooke JEK, Greenwood JS, Korhnak TE, Davis JM (2001) Vegetative storage protein expression during terminal bud formation in poplar. *Canadian Journal of Forest Research* **31**, 1098-1103.
- Lemaire G, Allirand JM (1993) Relation entre croissance et qualité de la luzerne : interaction génotype-mode d'exploitation. *Fourrages* **134**, 183-198.
- Leterme P (1988) Croissance et développement du colza d'hiver : les principales étapes. In *Physiologie et élaboration du rendement du colza d'hiver*, CETIOM-INRA, Paris, pp 23-33.
- Li H, Oba K (1985) Major soluble proteins of sweet potato roots and changes in proteins after cutting, infection, or storage. *Agricultural and Biological Chemistry* **49**, 737-744.
- Li R, Joern BC, Volenec JJ, Cunningham SM (1996) Seasonal changes in nonstructural carbohydrates, protein and macronutrients in roots of alfalfa, red clover, sweetclover, and birdsfoot trefoil. *Crop Science* **36**, 617-623.
- Li C, Puhakainen T, Welling A, Viherä-Aarnio A, Ernstsén A, Junttila O, Heino P, Palva ET (2002) Cold acclimation in silver birch (*Betula pendula*). Development of freezing tolerance in different tissues and climatic ecotypes. *Physiologia Plantarum* **116**, 478-488.
- Li C, Junttila O, Ernstsén A, Heino P, Palva ET (2003) Photoperiod control of growth, cold acclimation and dormancy development in silver birch (*Betula pendula*) ecotypes. *Physiologia Plantarum* **117**, 206-212.

- Limami MA, Dufossé C, Richard-Molard C, Fouldrin K, Roux L, Morot-Gaudry JF (1996) Effects of exogenous nitrogen ( $^{15}\text{NO}_3^-$ ) on utilization of vegetative storage protein (VSP) during regrowth in chicory (*Cichorium intybus*). *Journal of Plant Physiology* **149**, 564-572.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall NT (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275.
- Luan S (2002) Signalling drought in guard cells. *Plant, Cell and Environment* **25**, 229-237.
- Masclaux C, Quilleré I, Gallais A, Hirel B (2001) The challenge of remobilisation in plant nitrogen economy. A survey of physio-agronomic and molecular approaches. *Annals of applied Biology* **138**, 69-81.
- Mason HS, Mullet JE (1990) Expression of two vegetative storage protein genes during development and in response to water deficit, wounding and jasmonic acid. *The Plant Cell* **2**, 569-579.
- Mason HS, De Wald DB, Creelman RA, Mullet JE (1992) Coregulation of soybean vegetative storage protein gene expression by methyljasmonate and soluble sugars. *Plant Physiology* **98**, 859-867.
- Mauriès M (1994) La luzerne aujourd'hui. Eds France Agricole, Noisy-le-Grand.
- Mauriès M, Paillat J, (1997) Culture et utilisation de la luzerne : pratiques des éleveurs de bovins du centre de la Charente. *Fourrages* **149**, 69-79.
- Mc Conn M, Creelman RA, Bell E, Mullet JE, Browse J (1997) Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **94**, 5473-5477.
- Mc Ewan M, Macfarlane Smith WH (1998) Identification of volatile organic compounds emitted in the field by oilseed rape (*Brassica napus* L. spp. *oleifera*) over the growing season. *Clinical and Experimental Allergy* **28**, 332-338.
- Mendham NJ, Scott RK (1975) The limiting effect of plant size at inflorescence initiation on subsequent growth and yield of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Agricultural Science* **84**, 487-502.
- Merrien A, Pouzet A (1988) Principaux facteurs limitant les rendements du colza d'hiver dans les conditions françaises. In *Physiologie et élaboration du rendement du colza d'hiver*, CETIOM-INRA, Paris, pp 16-22.
- Merril CR (1990) Gel staining techniques. *Methods in Enzymology* **182**, 477-488.
- Meuriot F, Avise JC, Decau ML, Simon JC, Lainé P, Volenec JJ, Ourry A (2003a) Accumulation of N reserves and vegetative storage proteins (VSP) in taproots of non-nodulated alfalfa (*Medicago sativa* L.) are affected by mineral N availability. *Plant Science* **165**, 709-718.
- Meuriot F, Noquet C, Avise JC, Volenec JJ, Cunningham SM, Sors TG, Caillot S, Ourry A (2003b) Methyl jasmonate alters N partitioning, N reserves accumulation and induces gene expression of a 32-kDa vegetative storage protein that possesses chitinase activity in *Medicago sativa* taproots. *Physiologia Plantarum*, in press.
- Meyer A, Miersch O, Buttner C, Date W, Sembdner G (1984) Occurrence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants. *Journal of Plant Physiology* **3**, 1-8.
- Millard P (1988) The accumulation and storage of nitrogen by herbaceous plants. *Plant, Cell and Environment* **11**, 1-8.

- Millard P, Robinson D, Mackie-Dawson LA (1989) Nitrogen partitioning within the potato (*Solanum tuberosum* L.) plant in relation to nitrogen supply. *Annals of Botany* **63**, 289-296.
- Mira H, Martinez N, Penarrubia L (2002) Expression of a vegetative storage protein gene from *Arabidopsis* is regulated by copper, senescence and ozone. *Planta* **214**, 939-946.
- Morot-Gaudry JF, Monget C, Fiala V, Nicol MZ, Deroche ME, Jolivet E (1987) Transport et mise en réserve des photo-assimilats dans les racines de luzerne au cours de la végétation de printemps et d'automne. In *Nutrition azotée des légumineuses*, Versailles. 19-21 Novembre 1985. Ed INRA, Paris, Les colloques de l'INRA **37**, 165-173.
- Mussigmann C, Ledoigt G (1989) Major storage proteins in jerusalem artichoke tubers. *Plant Physiology and Biochemistry* **27**, 81-86.
- Noodén LD (1988) abscissic acid, auxin, and other regulators of senescence. In *Senescence and aging in plants*. Eds LD Noodén et AC Leopold, San Diego, Academia Press, pp 329-368.
- Noodén LD, Guiamét JJ, John I (1997) Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum* **101**, 746-753.
- Noquet C (1999) Régulation de la mise en réserve d'azote sous forme de protéines dans le pivot de *Medicago sativa* L. : incidence des facteurs environnementaux et endogènes. Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies, Université de Rennes, 29 p.
- Noquet C, Avice JC, Ourry A, Volenec JJ, Cunningham SM, Boucaud J (2001) Effects of environmental factors and endogenous signals on N uptake, N partitioning and taproot storage protein accumulation in *Medicago sativa*. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**, 279-288.
- Noquet C, Meuriot F, Caillot S, Avice JC, Ourry A, Cunningham SM, Volenec JJ (2003) Short-day photoperiod induces changes in N uptake, N partitioning and accumulation of vegetative storage proteins in two *Medicago sativa* cultivars. *Functional Plant Biology* **30**, 853-863.
- Odaira M, Yoshida S, Maeshima M (1997) Accumulation of a glycoprotein that is homologous to a seed storage protein in mung bean hypocotyls at the late stage of tissue elongation. *Plant Cell and Physiology* **38**, 290-296.
- Ohto M, Hayashi K, Isobe M, Nakamura K (1995) Involvement of Ca<sup>2+</sup>-signaling in sugar-inducible expression of genes coding for sporamin and  $\beta$ -amylase of sweet potato. *The Plant Journal* **7**, 297-307.
- O'Kennedy BT, Titus JS (1979) Isolation and mobilization of storage proteins from apple shoot bark. *Physiologia Plantarum* **45**, 419-424.
- Olsen FL, Skriver K, Müller-Uri F, Raikhel NV, Rogers JC, Mundy J (1992) ABA- and GA-responsive gene expression. Society for Experimental Biology Seminar Series 49 : *Inducible Plant Proteins*. Ed JL Wray, Cambridge University Press, pp. 139-153.
- Olsen JE, Junttila O, Nilsen J, Eriksson ME, Martinussen I, Olsson O, Sandberg G, Moritz T (1997) Ectopic expression of oat phytochrome A in hybrid aspen changes critical daylength for growth and prevents cold acclimatization. *The Plant Journal* **12**, 1339-1350.
- Olszewski N, Sun T, Gubler F (2002) Gibberellin signaling : biosynthesis, catabolism, and response pathways. *The Plant Cell Supplement*, 61-80.
- Osaki M, Yamada S, Tadano T (1995) Effect of sink manipulation on nitrogen accumulation and distribution among organs of gramineae and leguminosae. *Soil science and plant nutrition* **41**, 33-44.

- Ougham HJ, Davies TGE (1990) Leaf development in *Lolium temulentum*. Gradients of RNA complement and plastid and non-plastid transcripts. *Physiologia Plantarum* **79**, 331-338.
- Ourry A, Kim TH, Boucaud J (1994) Nitrogen reserve mobilization during regrowth of *Medicago sativa* L.: relationships between their availability and regrowth yield. *Plant Physiology* **105**, 831-837.
- Ourry A, Macduff JH, Volenec JJ, Gaudillère JP (2001) Nitrogen traffic during plant growth and development. In *Plant Nitrogen*. Eds JF Morot-Gaudry et P Lea, Springer Verlag, pp. 255-273.
- Paiva E, Lister RM and Park WD (1983) Induction and accumulation of a major tuber proteins in stems and petioles. *Plant Physiology* **71**, 161-168.
- Penheiter AR, Duff SMG, Sarath G (1997) Soybean root nodule acid phosphatase. *Plant Physiology* **114**, 597-604.
- Penheiter (1998) Biochemical and genetic characterization of an acid phosphatase/5'-nucleotidase from soybean root nodules. Thèse de Doctorat, Université de Nebraska, Lincoln.
- Peterson GL (1983) Determination of total protein. *Methods in Enzymology* **91**, 95-119.
- Peumans WJ, Proost P, Swennen RL, Van Damme Els JM (2002) The abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative storage protein and most probably serves as an important supply of amino acids for the synthesis of ripening-associated proteins. *Plant Physiology* **130**, 1063-1672.
- Philippot S, Allirand JM, Chartier M, Gosse G (1991) The role of different daily irradiations on shoot growth and root / shoot ratio in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Annals of Botany* **68**, 329-335.
- Pic E, Teyssendier de la Serve B, Tardieu F, Turc O (2002) Leaf senescence induced by mild water deficit follows the same sequence of macroscopic, biochemical, and molecular events as monocarpic senescence in pea. *Plant Physiology* **128**, 236-246.
- Quail PH, Boylan MT, Parks BM, Short TW, Xu Y, Wagner D (1995) Phytochromes : photosensory perception and signal transduction. *Science* **268**, 675-680.
- Rao MV, Lee H, Creelman RA, Mullet J E, Davis KR (2000) Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *The Plant Cell* **12**, 1633-1646.
- Rathke GW (2000) Auswirkung von Vorfrucht und Stickstoff(N)-Düngung auf die Energiebilanz des Winterrapsanbaus. Thèse de Doctorat, Faculté d'Agriculture d'Halle-Wittenburg.
- Rinne P, Saarelainen A, Juntilla O (1994) Growth cessation and bud dormancy in relation to ABA level in seedlings and coppice shoots of *Betula pubescens* as affected by a short photoperiod, water stress and chilling. *Physiologia Plantarum* **90**, 451-458.
- Rood SB, Major DJ (1984a) Influence of plant density, nitrogen, water supply and pod or leaf removal on growth of oilseed rape. *Field Crop Research* **8**, 323-331.
- Rood SB, Major DJ, Carefoot JM, Bole JB (1984b) Seasonal distribution of nitrogen in oilseed rape. *Field Crop Research* **8**, 333-340.
- Rossato (2000) Remplissage en azote des tissus reproducteurs de *Brassica napus* L. : estimation des flux par marquage isotopique, caractérisation des protéines impliquées dans la mise en réserve et des facteurs induisant leur accumulation. Thèse de Doctorat, Université de Caen, France, 136 p.

- Rossato L, Laine P, Ourry A (2001) Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle : nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1655-1663.
- Rossato L, Le Dantec C, Laine P, Ourry A (2002a) Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle : identification, characterization and immunolocalization of a putative taproot storage glycoprotein. *Journal of Experimental Botany* **53**, 265-275.
- Rossato L, MacDuff JH, Laine P, Le Deunff E, Ourry A (2002b) Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle : effects of methyl-jasmonate on nitrate uptake, senescence, growth, and VSP accumulation. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1131-1141.
- Rossato L, Richard-Molard C, Beauclair P, Lainé P, Ourry A (2003) Effects of plant architecture on N cycling dynamics and occurrence of the 23 kDa VSP in *Brassica napus* L. during the growth cycle. *Plant Science*, soumise.
- Rowland LJ, Arora R (1997) Proteins related to endodormancy (rest) in woody perennials. *Plant Science* **126**, 119-144.
- Ryle GJA, Powel CE, Gordon AJ (1986) Defoliation in white clover : nodule metabolism, nodule growth and maintenance, and nitrogenase functioning during growth and regrowth. *Annals of Botany* **57**, 263-271.
- Sadka A, De Wald DB, May GD, Park WD, Mullet JE (1994) Phosphate modulates transcription of soybean *VspB* and other sugar-inducible genes. *The Plant Cell* **6**, 737-749.
- Sadras VO, Connor DJ, Whitfield DM (1993) Yield, yield components and source-sink relationships in water-stressed sunflower. *Field Crops Research* **31**, 27-39.
- Salisbury FG (1981) Responses to photoperiod. In *Physiological Plant Ecology. I : Responses to the Physical Environment*. Eds OL Lange, PS Nobel, CD Osmond, H Ziegler, Springer-Verlag, Berlin, pp. 135-167.
- Salvucci ME, Crafts-Brandner SJ (1995) Purification and properties of a unique nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase I that accumulates in soybean leaves in response to fruit removal. *Plant Physiology* **108**, 1269-1276.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning : A laboratory manual. *Second edition*, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sato K (1974) Growth and development of alfalfa plant under controlled environment: III- The effect of photoperiod and temperature on the growth and anatomical features of photosynthetic tissues. *Proceedings of the Crop Science Society of Japan* **43**, 59-67.
- Sauter JJ, Van Cleve B (1991) Biochemical, immunochemical, and structural studies of protein storage in poplar (*Populus x canadensis* <robusta>) wood. *Planta* **183**, 92-100.
- Schjoerring JK, Bock JGH, Gammelvind L, Jensen CR, Mogensen VO (1995) Nitrogen incorporation and remobilization in different shoot components of field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) as affected by rate of nitrogen application and irrigation. *Plant and Soil* **177**, 255-264.
- Staswick PE (1988) Soybean vegetative storage protein structure and gene expression. *Plant Physiology* **87**, 250-254
- Staswick PE (1989) Developmental regulation and the influence of plant sinks on vegetative storage protein gene expression in soybean leaves. *Plant Physiology* **89**, 309-315.

- Staswick PE (1990) Novel regulation of vegetative storage protein genes. *The Plant Cell* **2**, 1–6.
- Staswick PE, Huang J, Rhee Y (1991) Nitrogen and methyl jasmonate induction of soybean vegetative storage protein genes. *Plant Physiology* **96**, 130-136.
- Staswick PE (1992) Jasmonate, genes and fragrant signals. *Plant Physiology* **99**, 804-807.
- Staswick PE (1994) Storage proteins of vegetative plant tissues. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**, 303-322.
- Staswick PE, Zhang Z, Clemente TE, Specht JE (2001) Efficient down-regulation of the major vegetative storage protein genes in transgenic soybean does not compromise plant productivity. *Plant Physiology* **127**, 1819-1826.
- Stephenson LC, Bunker TW, Wesley ED, Grimes HD (1998) Specific soybean lipoxygenases localize to discrete subcellular compartments and their mRNAs are differentially regulated by source-sink status. *Plant Physiology* **116**, 923-933.
- Stepien V, Sauter JJ, Martin F (1994) Vegetative storage proteins in woody plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **32**, 185-192.
- Strickland JA, Orr GL, Walsh TA (1995) Inhibition of *Diabrotica* larval Growth by patatin, the lipid acyl hydrolase from potato tubers. *Plant Physiology* **109**, 667-674.
- Sylvester-Bradley R, Makepeace RJ (1984) A code for stages of development in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Aspects of Applied Biology* **6**, 399-419.
- T**a TC, MacDowall FDH, Faris MA (1990) Utilization of carbon and nitrogen reserves of alfalfa roots in supporting N<sub>2</sub>-fixation and shoot regrowth. *Plant and Soil* **127**, 231-236.
- Tamminen I, Makela P, Heino P, Palva ET (2001) Ectopic expression of ABI3 gene enhances freezing tolerance in response to abscisic acid and low temperature in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **25**, 1-8.
- Taylor BK, May LH (1967) The nitrogen nutrition of peach tree II. Storage and mobilization of nitrogen in young trees. *Australian Journal of Biological Science* **20**, 389-412.
- Tayo TO, Morgan DG (1979) Factors influencing flower and pod development in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Agricultural Science* **92**, 363-373.
- Thomas JA, Spradlin JE, Dygert S (1971) Plant and animal amylases. In *The Enzymes*. Ed PD Boyer, Ed 3, Vol 5. Academic Press, New York, pp. 115-189.
- Thomas B, Vince-Prue D (1997) Photoperiodism in Plants. Academic Press, London.
- Thomas H, Ougham H, Canter P, Donnison I (2002) What stay-green mutants tell us about nitrogen remobilization in leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **53**, 801-808.
- Tittonel ED (1988) La phase automnale chez le colza d'hiver. In *Physiologie et élaboration du rendement du colza d'hiver*, CETIOM-INRA, Paris, pp 59-67.
- Tittonel ED, Chaput JP, Letoublon F, Bonnot O (1988) Reprise au printemps et mise à fleurs chez le colza d'hiver. In *Physiologie et élaboration du rendement du colza d'hiver*, CETIOM-INRA, Paris, pp 68-72.
- Tollenaar M (1977) Source-sink relationships during reproductive development in maize. A review. *Maydica* **22**, 49-75.

- Tonón C, Daleo G, Oliva C (2001) An acidic  $\beta$ -1, 3 glucanase from potato tubers appears to be patatin. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**, 849-854.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceeding of National Academic Science* **76**, 4350-4354.
- Tranbarger TJ, Franceschi VR, Hildebrand DF, Grimes HD (1991) The soybean 94-kilodalton vegetative storage protein is a lipoxygenase that is localized in paraveinal mesophyll cell vacuoles. *The Plant Cell* **3**, 973-987.
- Tribloi-Blondel AM (1988) Azote, croissance, rendement et qualité de la graine chez le colza d'hiver. In *Physiologie et élaboration du rendement du colza d'hiver*, CETIOM-INRA, Paris, pp 134-139.
- Utsugi S, Sakamoto W, Murata M, Motoyoshi F (1998) *Arabidopsis thaliana* vegetative storage protein (VSP) genes : gene organization and tissue-specific expression. *Plant Molecular Biology* **38**, 565-576.
- Vance CP, Heichel GH, Barnes DK, Bryan JW, Johnson LE (1979) Nitrogen fixation, nodule development, and vegetative regrowth of alfalfa (*Medicago sativa* L.) following harvest. *Plant Physiology* **64**, 1-8.
- Vance CP, Heichel GH (1981) Nitrate assimilation during vegetative regrowth of alfalfa. *Plant Physiology* **68**, 1052-1056.
- Van Cleve B, Clausen S, Sauter JJ (1988) Immunochemical localization of a storage protein in poplar wood. *Journal of Plant Physiology* **133**, 3146-3153.
- Van Cleve B, Apel K (1993) Induction by nitrogen and low temperature of storage protein synthesis in poplar trees exposed to long days. *Planta* **189**, 157-160.
- Van Damme Els JM, Hause B, Hu J, Barre A, Rougé P, Proost P, Peumans WJ (2002) Two distinct jacalin-related lectins with a different specificity and subcellular location are major vegetative storage proteins in the bark of the black mulberry tree. *Plant Physiology* **130**, 757-769.
- Vick BA, Zimmerman DC (1986) Characterization of 12-oxo-phytodienoic acid reductase in corn. *Plant Physiology* **80**, 202-205.
- Vogelmann TC, Dickson RE, Larson PR (1985) Comparative distribution and metabolism of xylem-borne amino compounds and sucrose in shoots of *Populus deltoides*. *Plant Physiology* **77**, 418-428.
- Volenc JJ, Ourry A, Joern BC (1996) A role for nitrogen reserves in forage regrowth and stress tolerance. *Physiologia Plantarum* **97**, 185-193.
- Volenc JJ, Cunningham SM, Haagenson DM, Berg WK, Joern BC, Wiersma DW (2002) Physiological genetics of alfalfa improvement : past failures, future prospects. *Field Crop Research* **75**, 97-110.
- Voltas J, Romagosa I, Araus JL (1997) Grain size and nitrogen accumulation in sink-reduced barley under Mediterranean conditions. *Field Crop Research* **52**, 117-126.
- Welling A, Kaikuranta P, Rinne P (1997) Photoperiodic induction of dormancy and freezing tolerance in *Betula pubescens* : involvement of ABA and dehydrins. *Physiologia Plantarum* **100**, 119-125.

- Welling A, Moritz T, Tapio Palva E, Junttila O (2002) Independent activation of cold acclimation by low temperature and short photoperiod in hybrid aspen. *Plant Physiology* **129**, 1633-1641.
- Wenzler H, Mignery G, Fisher L, Park W (1989) Sucrose-regulated expression of a chimeric potato tuber gene in leaves of transgenic tobacco plants. *Plant Molecular Biology* **13**, 347-354.
- Wetzel S, Demmers C, Greenwood JS (1989) Seasonally fluctuating bark proteins are a potential form of nitrogen storage in three temperate hardwoods. *Planta* **178**, 275-281.
- Wittenbach VA (1982) Effect of pod removal on leaf senescence in soybeans. *Plant Physiology* **70**, 1544-1548.
- Wittenbach VA (1983) Purification and characterization of a soybean leaf storage glycoprotein. *Plant Physiology* **73**, 125-129.
- Xu XY, Bewley JD, Greenwood JS (2000) Cloning and characterization of an 18 kiloDalton protein in the roots of the perennial weed *Taraxacum officinale* Weber (Dandelion) which has allergen- and pathogenesis-related protein properties. *Plant, cell and environment* **23**, 1227-1236.
- Xu LH, Liu FQ, Wang ZL, Peng W, Huang R, Huang D, Xie D (2001) An *Arabidopsis* mutant *cex1* exhibits constant accumulation of jasmonate-regulated *AtVSP*, *Thi2.1* and *PDF1.2*. *FEBS Letters* **494**, 161-164.
- Yeh KW, Chen JC, Lin MI, Chen YM, Lin CY (1997) Functional activity of sporamin from sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) : a tuber storage protein with trypsin inhibitory activity. *Plant Molecular Biology* **33**, 565-570.
- Yeh S, Moffatt BA, Griffith M, Xiong F, Yang DSC, Wiseman SB, Sarhan F, Danyluk J, Xue YQ, Hew CL, Doherty-Kirby A, Lajoie G (2000) Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals. *Plant Physiology* **124**, 1251-1263.
- Yoshida K, Baba K, Yamamoto N, Tazaki K (1994) Cloning of a lectin cDNA and seasonal changes in levels of the lectin and its m-RNA in the inner bark of *Robinia pseudoacacia*. *Plant Molecular Biology* **255**, 845-853.
- Zeevaart JAD, Creelman RA (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**, 439-473.
- Zhang QZ, Kullmann A, Geisler G (1991) Nitrogen transportation in oilseed rape (*Brassica napus* L.) plant during flowering and early siliqua developing. *Journal of Agronomy and crop Science* **167**, 229-235.
- Zhu B, Coleman GD (2001a) The poplar bark storage protein gene (*bspA*) promoter is responsive to photoperiod and nitrogen in transgenic poplar and is active in floral tissues, immature seeds and germinating seeds of transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology* **46**, 383-394.
- Zhu B, Coleman GD (2001b) Phytochrome-mediated photoperiod perception, shoot growth, glutamine, calcium, and protein phosphorylation influence the activity of the poplar bark storage protein gene promoter (*bspA*). *Plant Physiology* **126**, 342-351.

**Carine NOQUET (2003). Nitrogen storage as vegetative storage proteins (VSP) in *Medicago sativa* L. and *Brassica napus* L. : main factors of regulation.** University thesis, Rennes, France, 151 p.

**Abstract** - In alfalfa (*Medicago sativa* L.) and oilseed rape (*Brassica napus* L.), vegetative storage proteins (VSP) accumulated in taproots are involved in transient nitrogen storage and nitrogen supply during critical phases of shoot growth when the levels of photosynthetic activity and nitrogen uptake are restricted. Factors that modulate VSP accumulation in both species remain largely unknown. The aim of this thesis was to study regulation of VSP synthesis by environmental, trophic, hormonal signals or following changes in nitrogen source-sink relationships.

In non-nodulated alfalfa (cv Europe) grown under controlled conditions, an increase in availability of mineral nitrogen doubled plant total dry matter, but did not affect taproot VSP content (57, 32, 19, and 15 kDa polypeptides). Reduction in daylength or exposing plants to low temperatures increased the nitrogen allocation to root tissues. However, only exposure to short-day photoperiod led to taproot VSP accumulation and to the increase of transcripts for *vsp 57* and *vsp 32* (cv Europe and Lodi). Cultivar differences in short day response was due to higher transcript abundance in Europe, cultivar native to northern latitude. A preliminary study of the impact of short day signal (Europe) suggests (i) that the perception of this signal occurs at the foliar level, and could be phytochrome-mediated and (ii) that the hormonal balance between abscisic acid/gibberellins may be involved in the signal transduction. Application of methyl-jasmonate (MeJA) to roots led to preferential allocation of nitrogen to taproots and resulted in accumulation of VSPs in this organ.

In oilseed rape grown in field conditions (cv Capitol), regulation of the accumulation of the 23 kDa VSP has been studied in relation to changes in nitrogen allocation consecutively to alterations in source-sink relationships. During normal ontogenetic cycle, our results confirm and precise the kinetics of VSP accumulation during flowering, and its remobilization during pod filling. Leaf halving at bolting (source organ) delayed development, and resulted in later and lower VSP accumulation as compared to control plants. Stem removal at bolting (sink organ) prevented VSP accumulation. Continuous removal of flowers and pods (sink organs) increased shoot growth initially, but resulted in a massive, but delayed, accumulation of VSP in taproots and stems. Accumulation of VSP in oilseed rape was linked to remobilization of nitrogen from senescing leaves and resulted from a delay between nitrogen availability in leaves and a low demand of reproductive sinks. In our experiment, VSP was remobilized only when pods develop, becoming a key nitrogen sink.

Two schemes that summarize the main mechanisms potentially regulating VSP accumulation in both species are proposed. Accumulation of VSPs under short-day photoperiod or following application of MeJA in alfalfa, or during development in oilseed rape may occur directly (by gene induction) and indirectly (through changes in source-sink relationships). In alfalfa, alternatively to their storage role, VSPs could also play a role in winter survival or in plant protection against pathogens, as a strong amino acid sequence homology of the 32 kDa VSP to chitinases has been recently reported. In oilseed rape, VSP could be a nitrogen storage buffer between nitrogen losses from leaf senescence (implying potentially MeJA as reported by previous studies) and pod filling. VSP could be a qualitative indicator of source-sink nitrogen status within the plant.

**Keywords** : alfalfa, oilseed rape, VSP, regulation, N allocation, N reserves, short day, source-sink relationships.

**Carine NOQUET (2003). Mise en réserve d'azote sous forme de protéines de réserve des organes végétatifs (VSP) chez *Medicago sativa* L. et *Brassica napus* L. : principaux facteurs de régulation.** Thèse de l'Université de Rennes, 151 p.

**Résumé** - Chez la luzerne (*Medicago sativa* L.) et le colza (*Brassica napus* L.), des protéines de réserve des organes végétatifs (VSP : vegetative storage protein) accumulées dans le pivot sont fortement impliquées dans le stockage d'azote transitoire et la fourniture d'azote au cours de phases intenses de croissance lorsque l'activité photosynthétique et l'absorption d'azote sont limitantes. Les facteurs capables de moduler le niveau d'accumulation des VSP chez ces deux espèces étant mal connus, l'objectif de ce travail de thèse était d'étudier la régulation de la synthèse de ces protéines de réserve par des signaux environnementaux, trophiques, hormonaux ou en réponse à des modifications des relations source-puits pour l'azote.

Chez la luzerne non-nodulée (variété Europe) cultivée en conditions contrôlées, une augmentation de la disponibilité en azote minéral multiplie par deux la production de matière sèche totale sans mener à un accroissement de la teneur en VSP (57, 32, 19 et 15 kDa). Le raccourcissement de la longueur du jour ou l'application de basses températures favorisent la redistribution de l'azote vers les parties racinaires. Cependant, seule l'héméropériode courte conduit à l'accumulation des VSP et à l'induction des transcrits *vsp 57* et *vsp 32* (variétés Europe et Lodi). Un effet variétal de la réponse aux jours courts a été démontré, avec une accumulation de ces transcrits supérieure pour Europe, cultivar d'origine plus nordique. Une étude préliminaire de l'effet du signal "jours courts" (Europe) suggère (i) que ce signal pourrait être perçu au niveau foliaire par le système phytochrome et (ii) que la balance hormonale acide abscissique/gibbérellines serait impliquée dans la voie de transduction de ce signal. Une application racinaire de méthyl-jasmonate (MeJA) privilégie la répartition d'azote vers le pivot et entraîne également une accumulation de VSP au sein de cet organe.

Chez le colza cultivé au champ (variété Capitot), la régulation de l'accumulation de la VSP de 23 kDa a été étudiée en relation avec les changements de répartition de l'azote suite à un bouleversement des relations source-puits. Au cours d'un cycle de développement normal, nos résultats ont permis de confirmer et d'affiner la cinétique d'accumulation de la VSP lors de la floraison et sa remobilisation pendant le remplissage des siliques. La suppression de 50 % des feuilles de la rosette au début de la montaison (organe source) provoque un retard de développement qui se traduit par une accumulation de la VSP plus tardive et plus faible que chez le témoin. L'ablation de la hampe au début de la montaison (organe puits) ne conduit à aucune accumulation de la VSP. La suppression continue des organes puits reproducteurs (inflorescences ou siliques) induit un développement important des parties aériennes. La VSP n'est alors accumulée que de façon tardive mais massive dans le pivot et la hampe. L'accumulation de la VSP chez le colza est donc consécutive à la remobilisation de l'azote des feuilles sénescentes et ne se produit qu'en cas de décalage entre l'offre en azote des feuilles et la demande des organes reproducteurs encore faible ou inexistante. Dans nos conditions d'expérimentation, la VSP n'est remobilisée que si les siliques se développent et deviennent les puits prioritaires pour le remplissage.

Deux schémas de synthèse présentant les principaux mécanismes de régulations potentielles de l'accumulation des VSP chez les deux espèces sont proposés. L'accumulation des VSP sous l'effet d'une héméropériode courte ou d'une application de MeJA chez la luzerne ou au cours du développement chez le colza, résulterait d'une action directe (induction des gènes) et indirecte (*via* la modification des relations source-puits pour l'azote). Chez la luzerne, alternativement à leur fonction de réserve, les VSP pourraient avoir un rôle dans la survie hivernale et la protection contre les pathogènes, comme l'atteste la découverte récente d'une forte homologie de séquence en acides aminés de la VSP de 32 kDa avec des chitinases. Chez le colza, la VSP pourrait constituer une réserve azotée "tampon" entre les pertes d'azote issues de la sénescence foliaire (impliquant potentiellement le MeJA, comme l'établissent des études antérieures) et le remplissage des siliques. Elle pourrait ainsi constituer un indicateur qualitatif du statut source-puits de la plante pour l'azote.

**Mots-clés** : luzerne, colza, VSP, régulation, répartition d'azote, réserves azotées, jours courts, relations source-puits.