



Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de Doctorat

Spécialité Sciences Agronomiques, Biotechnologies Agro-alimentaires

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Caractérisation de la machinerie protéolytique associée à une remobilisation efficiente de l'azote pendant la sénescence dans le but d'optimiser l'efficience d'usage de l'azote chez le colza (*Brassica napus* L.)

Présentée et soutenue par
Marine PORET

Thèse soutenue publiquement le 14 décembre 2016
devant le jury composé de

M. Patrick GALLOIS	Professeur / School of Biological Sciences, University of Manchester	Rapporteur
M. Edouard PESQUET	Professeur Associé / Department of Ecology, Environment and Plant Sciences, Stockholm University	Rapporteur
Mme Céline MASCLAUX-DAUBRESSE	Directeur de recherche / Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA Versailles, UMR1318 INRA-AgroParisTech	Examinatrice
M. Alain BOUCHEREAU	Professeur / Université de Rennes 1, Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, UMR1349 INRA	Examineur
Mme Marie-Pascale PRUD'HOMME	Professeur / Université de Caen Normandie, UMR INRA/UCN 950 Ecophysiologie végétale, Agronomie et nutriments NCS	Examinatrice
M. Jean-Christophe AVICE	Professeur / Université de Caen Normandie, UMR INRA/UCN 950 Ecophysiologie végétale, Agronomie et nutriments NCS	Directeur de thèse

Thèse dirigée par le Professeur Jean-Christophe AVICE
UMR INRA-UCN 950 EVA Écophysiologie Végétale Agronomie et nutriments NCS



REMERCIEMENTS

En premier lieu, je souhaite remercier la directrice et le directeur adjoint de l'UMR 950 INRA-UCBN EVA, **Marie-Pascale Prud'homme** et **Philippe Lainé**. Merci de m'avoir accueillie pendant 5 années au sein de ce laboratoire. **Marie**, un grand merci pour tes cours supers, pour tes conseils avisés de chaque instant, pour ton soutien pendant ma phase de rédaction et merci pour la joie de vivre que tu diffuses. **Philippe L**, merci d'être le tonton de tous les « jeunes » ici et de t'inquiéter pour nous tous. **A vous deux**, je vous suis extrêmement reconnaissante du cadre bienveillant et familial que vous offrez à ce laboratoire, ce fut vraiment agréable de travailler dans ces conditions.

Mes remerciements se tournent également vers les membres de mon jury de thèse. Je suis très honorée que le Pr Patrick gallois et le Pr Edouard Pesquet aient accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse et je les en remercie. Je remercie également le Dr Céline Masclaux-Daubresse, le Pr Alain Bouchereau et le Pr Marie-Pascale Prud'Homme d'avoir accepté d'être examinateurs de ce travail écrit et oral.

Je tiens à remercier l'école doctorale NBISE pour le financement d'une partie de mon séjour à l'Université d'OXFORD. Je remercie également le programme RAPSODYN pour le financement de mes nombreux déplacements notamment à Oxford ainsi qu'au Canada. Enfin, je remercie le projet PHC STAR pour le financement de mon séjour en Corée du sud.

Il est à présent temps de remercier une des personnes sans qui rien de tout cela n'aurait été possible, mon directeur de thèse, le Professeur **Jean-Christophe Avice**! Merci JC d'avoir cru en moi depuis plus de 5 ans ! Merci de m'avoir suivi dans mes envies de collaborations, de m'avoir permis d'aller me former à de superbes techniques à Oxford mais aussi d'aller à de nombreux congrès au Canada et en Corée du Sud ! Je pense qu'un directeur de thèse ne doit pas seulement coacher le travail de son thésard mais surtout lui apprendre à devenir un chercheur à part entière et je pense que tu m'as grandement aidé à voler de mes propres ailes (de fée clochette)! Tu m'as toujours poussé vers le haut, laissé la possibilité d'évoluer et de m'améliorer, tu m'as souvent guidé et montré la voie sans pour autant me la tracer et c'est l'une des meilleures écoles ! Merci pour ta gentillesse, pour ta compréhension dans les moments plus difficiles et pour les nombreuses heures de correction et de relecture que tu as du faire sur la fin : Merci pour tout !

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à mes collaborateurs. Je remercie particulièrement le Pr **Renier A.L van der Hoorn** pour son accueil au sein de son laboratoire à l'Université d'Oxford. Merci pour cette collaboration fructueuse qui a énormément participé à l'élaboration de ce travail de thèse. Je remercie tous les membres du Plant Chemetics Laboratory, Department of Plant Sciences, et plus particulièrement **Bala** et sa patience sans qui je n'aurais jamais pu comprendre les manips en anglais ! Je remercie également le Pr **Tae-Hwan Kim** et **Bok-Rye Lee** pour leur collaboration à ces travaux de thèse ainsi que pour leur accueil en Corée du Sud. Mes remerciements s'adressent aussi au Professeur **Alain Bouchereau** pour son accueil au sein de l'UMR INRA-1349. Merci pour cette collaboration et également pour les échanges réalisés lors des diverses réunions « workpackage » de RAPSODYN ainsi qu'au Canada. Un grand merci à **Sylvain Déchaumet** pour m'avoir aidé à faire les manips « phytohormones » de ma thèse et pour son aide lors du traitement des données. Merci pour ton super accueil, ta patience et toutes les discussions que l'on a pu avoir lors de cette collaboration. Je remercie enfin le Dr **Céline Masclaux-Daubresse** ainsi que **Marien Havé** pour les divers échanges constructifs et très intéressants que j'ai pu avoir avec eux lors des congrès.

Un grand merci à **Isabelle Mussio** et **Juliette Fauchot**, j'ai particulièrement apprécié mes 2 années consécutives d'enseignements et pour cela je vous en remercie très sincèrement. Merci aussi à mes partenaires d'enseignement et amis **Alexis** et **Elise**. J'en profite pour remercier les **étudiants** sur qui j'ai testé mes capacités d'enseignante novice! J'espère que vous avez apprécié parce que cela m'a été d'une aide

précieuse. Sachez qu'à chaque fois que je vous ai dit : « certaines années les étudiants font comme ceci ou comme cela »... c'était totalement faux parce que c'était ma première année et que je n'avais pas encore eu d'autres élèves! Il fallait que je vous l'avoue, c'était maintenant ou jamais! Je remercie également **Quentin C.**, mon premier et seul stagiaire, t'encadrer a été une super expérience ! Merci d'avoir joué le jeu lorsque l'on ne comptait plus les heures d'infiltrations végétales sur feuilles de colza impossibles à infiltrer!

☞ Maintenant l'EVA !!! Un grand merci à **JC, Jacques, Philippe E, Marie-pascale, Philippe L, Servane, Annette, Jean-Bernard, Emmanuelle, Sophie BM, Alain, Sylvain, Frederik LD et Frédérick M** pour tous les enseignements que vous m'avez apporté tout au long de mon cursus universitaire. Vous avez grandement participé à mon choix d'orientation vers le végétal! **Servane**, un grand merci pour ton aide précieuse sur mes statistiques de thèse mais également pour toutes les discussions qu'on a pu avoir sur le travail ou autres sujets, merci pour ton grand soutien et ta gentillesse pendant ma rédaction qui m'ont beaucoup aidé... au fait, mes remerciements sont enfin écrits, il était temps! Et je crois que je ne te remercierai jamais assez d'avoir participé au retour de ma cop's Elise au labo !! Merciiii !! **Jean-Bernard**, je te remercie pour les ateliers DOC's qui nous apprennent l'entraide et le jugement objectif, merci pour les TPs libres que j'ai particulièrement apprécié (c'est la première fois où je me suis sentie un peu chercheuse) et merci également pour tes superbes chemises et T-shirts (Dublin, mon préféré) ! **Annette**, merci pour tes conseils lors de mes premiers enseignements cela m'a beaucoup aidé à moins stresser et cela m'a fait beaucoup rire de te raconter mes péripéties de surveillance d'examen et de TP! **Emma**, qui aurait cru l'année dernière que nous ferions les mots fléchés du midi !? Rappelle toi comment nous nous moquions de cette habitude !!! Merci à toi pour les quelques cours de Pilates partagés, pour l'unique marche à la prairie (mais la motivation était là !) et merci pour ta sagesse sur tous les sujets qu'on a pu aborder toutes les deux! **Sophie BM**, merci pour toutes tes attentions quand je t'ai parlé de mon travail ainsi que pour ta gentillesse et toutes les rigolades en salle café avec les potins people! Un grand merci **Alain** pour ta pertinence sur tous les sujets du monde je crois! Tes questions lors des séminaires/réunions m'ont toujours impressionné et, même si j'avais la trouille de ne pas réussir à y répondre, cela m'a fait énormément progressé ! **Jacques**, tu as toujours été là pour moi et j'ai toujours pu partager avec toi mes doutes, mes pages blanches, mes problèmes divers et variés tout au long de la thèse ! Merci pour ton soutien, pour ta gentillesse, pour ton œil extérieur qui m'a aidé à y voir plus clair à maintes reprises ! Merci aussi pour la joie de vivre que tu véhicules tous les jours au labo et les rigolades qu'on a pu avoir ! Merci à ta famille aussi d'être comme toi, des frimousses enjouées et pétillantes ! **Philippe E.**, merci pour ta bonne humeur, ton humour, ta façon de me faire comprendre les choses sans forcément avoir besoin de parler ! Je me souviendrai toujours de la première fois où je t'ai parlé en te demandant « A quoi ça sert l'azote dans la plante ? », de la tête que tu as faite en levant les yeux au ciel et de ta réponse qui te ressemble tellement « Allez apprendre votre cours et on en reparle après » ! AhAh j'ai bien grandi depuis cette période et je pense que je te le dois beaucoup !

☞ Merci à tous les membres de ce labo EVA, « mon » labo que j'adore : **Josette, Magali, Anne-Françoise, Julie, Josiane, Sophie, Frédérine, Jehanne, Fanny, Marine, Olivier, Bénédicte, Dominique et Patrick**. Un grand merci aux filles de PLATIN pour les analyses IRMS que vous avez faites pour moi si rapidement ! **Frédérine**, merci pour ton sourire, pour les moments que l'on a partagé en Prot' et pour toutes les fois où j'ai adoré tes histoires de voitures mal garées (je n'en dirais rien de plus ^^ mais tu vois à quoi je pense !). **Jehanne et Fanny**, les filles, votre bonne humeur et votre humour m'ont fait un bien fou tous les jours, surtout pendant la rédaction, ne changez jamais vous êtes géniales ! **Marine**, merci pour ta bonne humeur, je te souhaite plein de bonnes choses en perspectives ! **Josiane**, un grand merci pour ton aide pour mes récoltes et là c'est promis je ne t'embêterais plus avec mes boîtes de cônes vides ^^ !!! Merci aussi pour les pauses café avec toutes nos rigolades surtout pendant la période AUM (C'était mémorable !) et un jour, je te le promets, j'irai voir cette statue bizarre dont tu m'as parlé ! **Sophie**, ma belle, merci pour le travail que je t'ai demandé pendant toute la thèse, un énorme merci pour ton soutien, pour ton humour dès le matin que j'adore, pour les rigolades et pour les câlins gratuits que je te demandais ^^ ! **Anne-Françoise, Afa**, j'aurais du mal en quelques lignes à te remercier pour tout ce que tu m'as apporté... Merci pour ton aide à la serre, pendant mes récoltes, mais aussi pour ton soutien dans les moments difficiles comme dans les bons moments. Tu as

toujours été là pour moi et je te remercie pour tout !! Merci **Matis** pour tous les moments partagés, je ne vous oublierai jamais ! **Julie**, ma bichette, merci pour ton humour, pour ton aide précieuse en BM où on manipulait toutes les deux, c'était génial! Tu décides de revenir au moment où je repars... pfff je te retiens! En tout cas, j'ai adoré tous ces moments, prend soin des filles, je penserais souvent à vous! **Magali et Josette**... ça va être très très dur de vous dire au revoir ! Les filles vous avez fait tant pour moi, que ce soit au labo avec votre aide pour mes récoltes et mes « boulettes » mais surtout pour votre soutien infaillible! Vous avez été parfois « Maman », parfois « grande sœur » et toujours « copine » ! Je pense que le labo n'aurait pas été pareil sans vous et je redoute le moment où je vais partir parce que vous allez énormément me manquer, je vous adore !

☞ Que seraient des remerciements sans remercier la team DOC'EVA !!! Ahhh les anciens... vous savez que vous me manquez beaucoup : **Philou, Alex**, mes mentors de la team JC, merci pour vos conseils quand je n'étais encore qu'une débutante et pour toutes les discussions, les rigolades et tous les moments partagés en Prot' et j'en passe! **Vincent**, merci pour ta gentillesse, ton soutien et ton aide, je crois que j'aurais bientôt dépassé le stade de « pauvre M2 et elle a le droit à un stylo pipette » ahahaha! **Caro**, merci pour nos rires dans le bureau aux moments où l'on arrivait plus à bosser et aussi pour les sessions « Sèche ta thèse » hihi chuutt ! Les sérapiettes, **Elise, S, Anne, Thaïs**, inséparables mais toujours là pour l'autre bureau ! Merci les filles pour votre soutien et pour les soirées mémorables à tourner des films ou des clips de cuisine, d'Indiana Jones ou encore Fort boyard!!! **Thaïs**, princesse, miss eva, c'est bientôt à nous d'être des anciennes, la thèse c'est presque terminé, merci pour ton soutien sur la fin, on s'en est sortie (je m'avance un peu là mais je n'en doute pas)! Bref, les anciens c'est avec vous qu'on a construit la team des Doc's et elle continue d'être géniale ! Les « piou-piou d'amour », **Maxence (bichon), Cylia, Emilie**, merci pour cette année avec vous dans le bureau et aussi les années d'avant... mes M2 préférés ! Merci pour les rigolades, les soirées et pour m'avoir écouté me plaindre de la rédaction hihi, préparez-vous bien un jour viendra votre tour (je vous mets la pression les p'tits loups, mais no stress tout se passera bien) ! Mention spéciale Maxou, je te transmets le relais de la recherche en thèse sur les protéases, hihi bonne chance !!! Merci aussi à tous les gens avec qui j'ai partagé ce bureau de fou : **Thomas B**, merci pour ta gentillesse et tous les moments qu'on a passé à discuter, à rigoler et à débattre sur tous les sujets, merci pour ton aide lors de ma deuxième année, t'as toujours été là quand j'avais besoin et tu réponds toujours présent si j'ai un problème, je t'en remercie! **Coraline**, belette, merci pour les bons moments passé avec toi ! Merci aussi à mes anciens compagnons de M2 et amis, mon **Pijounet (PJ)** et **Manue** pour toutes ces années de la licence au master, aux soirées et merci car j'ai adoré la fac grâce à vous ! Mes derniers remerciements de la team vont obligatoirement à Solène, Elise et Aurélia, les copines !!! **Solène**, La Post'Doc de la bande ^^, merci pour ta gentillesse, pour ton soutien, pour ton aide, pour les discussions, les rigolades, pour l'énergie que tu as pour deux quand j'ai les piles à plats, merci d'être arrivée et prends soin des filles pour moi !!! **Aurélia**, comment te dire... j'aurais détesté passer une vie sans te connaître ! Tu as égayé chacune de mes pauses, chacune de mes journées, tu m'as apporté énormément, tu m'as fait grandir et rajeunir à la fois ! Je pense que j'ai gagné de nombreuses années de vie avec nos délires (Ca suffat comme ça !!! Tout à fut !!!) et passer des journées sans te voir va me laisser un vide immense (je vais t'appeler tous les soirs je pense et **Seb** t'auras pas le choix hihi). Merci à vous deux, j'ai squatté chez vous et vous m'avez accueilli à bras ouverts, je vous en remercie ! **Elise**, de la licence à la fin de la thèse tu as toujours été là, on a vécu tellement de trucs ensemble et on a toujours pu compter l'une sur l'autre ! Je me rappelle tellement de bons souvenirs, tellement de temps toutes les deux dans les bons comme dans les mauvais moments ! Courage pour ta thèse, ça va le faire tu es tellement brillante ! Ne doutes jamais de toi, tu es merveilleuse! Tu vas énormément me manquer mais je serais toujours là pour toi quoi qu'il arrive et quelle que soit la distance !

☞ Mon mongnion, **Denis**, si on m'avait dit que tu te marierais au cours de mes années de thèse je crois que je ne l'aurais jamais cru ! Félicitations encore à toi et Ina ! Merci d'avoir été là pour moi toute ma vie que ce soit pour les attaques de « poux de loup avec leurs flèches », les cabanes dans les arbres, la peur de E.T, les « Plus de brocolis ? », les « pizzas quatre chaussures », pour Prague, pour ton mariage, pour les journées piscine et j'en passe ! Merci d'avoir été là pour avoir couvert mes premières fautes à mes parents, pour être venu dans les moments difficiles et pour avoir été mon meilleur ami depuis toujours ! Comme dirais Maman, tu as toujours été le seul membre de la famille qui vivait chez moi sans y dormir !!! Ma Fraise, **Siloë**, merci d'avoir

été là dans les très bons comme dans les mauvais moments ! J'ai toujours pu compter sur toi et tu sais que je serais toujours là pour toi en retour ! La distance n'y changera jamais rien et il me tarde de te voir pour « Une t'tite goutte » ! **Ma Lulu**, comment te remercier pour toutes ces années d'amitié ? Je pense qu'on reconnaît ces plus proches amis lorsqu'ils sont toujours là pour toi malgré la séparation, malgré la vie qui avance et je sais que le moindre de mes messages alarmants donnera lieu à un appel « SOS amies de toujours » ! Merci d'être toi, si pure et gentille ! **Emma**, ma belle, ma grande sœur, merci pour toutes ces années à rigoler derrière notre caisse à la CDM pendant l'été, merci pour les sorties plages, pour les cafés chez toi, pour les discussions plusieurs heures sans voir le temps passer. Merci, avec **Cyrille**, de m'avoir donné un p'tit bout d'chou Léandre.

🍃 **Les Etienne's, Ma Jo, Philippe, Julie!!!** Ces quelques lignes ne suffiront jamais... Vous avez été ma famille adoptive de Caen et je vous en remercie sincèrement ! Vous m'avez accueillie, nourrie et presque logée de nombreuses fois ! On a refait le monde autour d'une table comme les tontons flingueurs à imaginer des projets nous rendant riches ! Vous m'avez tellement soutenu et j'ai pu compter sur vous à n'importe quel moment (même quand vous étiez en vacances, hihi) ! Vous m'avez permis de grandir, d'évoluer, de murir et jamais je n'oublierais ça, je vous dois énormément ! Je vous dois certainement ma santé mentale ou peut-être l'inverse, je sais plus trop d'ailleurs ^^ !!!

🍃 Je tiens à enfin remercier toute ma famille : les Poret, Pepère et Mamie et les Maout pour votre amour inconsidéré et votre soutien sans faille ! Malgré la distance je pense souvent à vous et maintenant j'aurais le temps de venir un peu plus souvent !

🍃 **Alexandre**, pout, merci de m'avoir supporté durant cette 3^{ème} année de thèse. Merci de m'avoir fait découvrir à quel point la vie peut être joyeuse et de m'avoir ouvert les yeux sur beaucoup de choses. Merci d'avoir été là pour moi, cette année n'aurait pas été la même sans toi et j'espère que la vie nous mènera loin. Merci à toute ta famille pour leur accueil si chaleureux, vous êtes géniaux.

🍃 Et enfin les personnes les plus importantes dans ma vie : **Mon Papa**, tu as depuis toujours vu en moi des capacités que je ne soupçonnais même pas. Tu m'as poussé vers le haut tellement de fois, dans tout ce qu'on a pu traverser ces dernières années, et la fierté que je vois dans tes yeux me comble de bonheur mais saches que je suis aussi fière d'être ta fille ! **Ma Maman**, tu as un sixième sens de maman pour savoir si ça va ou pas même à distance. Tu m'as toujours soutenu et tu m'as aidé à devenir une femme aimante, gentille, altruiste et joyeuse à ton image ! Vous êtes à vous deux, mes modèles, je vous dois entièrement la personne que je suis devenue ! Merci pour votre soutien durant cette thèse et durant toute ma vie. **Mes sœurs**, mes princesses, mes amours, vous êtes ce qui compte le plus dans ma vie. **Elise**, ma belle, la première avec qui j'ai joué, la petite sœur que j'avais peur de casser en la prenant dans mes tous petits bras, la vie ne t'a pas épargnée ces dernières années mais tu es la personne la plus forte que je connaisse. Je suis fière de tout ce que tu as accompli et de la femme que tu es devenue ! Si on a appris quelque chose toutes les deux ces deux dernières années c'est que RIEN, ni les ruptures, ni la distance, ni la maladie ne pourront nous séparer, je ferais tout pour toi si tu me le demandais ! **Laure**, ma jumelle, à croire que nous avons été faites sur le même moule ! J'apprends tous les jours grâce à toi, tu es un exemple de bonté, de sagesse et d'amour. Tu trouves le bon quand je ne le vois pas et tu me dis de me méfier là où je ne vois pas le danger. Nos ressemblances sont troublantes et j'imagine le scénario parfait d'un chercheur fou prenant un de mes cheveux pour créer un clone de moi qui serait toi ^^ ! **Romane**, mon bébé, la petite dernière, quand je te vois aujourd'hui j'ai l'impression d'avoir loupé un épisode et de voir en face de moi la femme que tu es devenue sans avoir eu le temps de dire ouf. Tu as tellement grandi que j'ai l'impression que tu as sauvé la chine (^^) ! Ne grandit pas trop vite, reste innocente, vit ta vie pleinement sans sauter les étapes et profite ! A ma famille chérie, merci de m'avoir supporté et soutenue durant cette thèse et je suis fière de vous tous !

Abréviations

¹⁴N : azote 14

¹⁵N : azote 15

A

AALP : "Aleurain-like protease"

ABA : acide abscissique

ABPP : "Activity binding protein profiling"

ACN : Acétonitrile

ADN (DNA) : Acide désoxyribonucléique

ANOVA : Analyse de variance

AP : "Aspartic protease" (Protéase à aspartate)

AAP : "Amino acid permease"

ARN (RNA) : Acide ribonucléique

AS : Asparagine synthétase

ATP : Adénosine tri-phosphate

B

BR : Brassinostéroïde

BSA : Serum albumin bovine

C

C : Carbone

Cab : "Chlorophyll a/b binding protein"

Canola : "Canadian oil, low acid"

Cbb : "Coomassie brilliant blue"

CCV : "Chloroplast-vesiculation containing vesicle"

CETIOM : Centre technique interprofessionnel des oléagineux et du chanvre

CHATS : "Constitutive high affinity transport system"

CIPAN : Culture intermédiaire piège à nitrate

CK : Cytokinine

CLATS : "Constitutive low affinity transport system"

Clp : Protéase caséinolytique

CND41 : "Chloroplast nucleoid DNA binding protein 41"

CP : "Cysteine protease" (Protéase à cystéine)

CXE : "Carboxylesterase"

D

D : Day

Deg : "Degradation of periplasmic protein"

DFP :

Diisopropylfluorophosphate

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DTT : Dithiothreitol

E

EAA (NAE) : Efficience d'assimilation de l'azote

EAbA (NuPE) : Efficience d'absorption de l'azote

ECL : Enhanced chemiluminescence

EDTA : Ethylène diamine tétra acétique

ERA (NRE) : Efficience de remobilisation de l'azote

ET : Etylène

EUA (NUE) : Efficience d'usage de l'azote

EutA (NuTe) : Efficience d'utilisation de l'azote

ExoP : Exopeptidase

F

FtsH : "Filamentation temperature-sensitive H"

G

GA : Gibbérellines

GDH : Glutamate deshydrogénase

GES : Gaz à effet de serre

GLB : "Gel loading buffer"

GOGAT : Glutamine oxoglutarate

aminotransférase

GS : Glutamine synthétase

H

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

ha : Hectare

HN : "High nitrate"

(Traitement fort en nitrate)

I

IAA : "Indole acetic acid", Auxine

IGEPP : Institut de génétique, environnement et protection des plantes, Rennes

IHATS : "Inducible high affinity transport system"

ILATS : "Inducible low affinity transport system"

IPT : Isopentenyltransférase

INN : Indice de nutrition azotée

INRA : Institut national de la recherche en agronomie

IRMS : "Isotope ratio mass spectrometry"

J

J : jour

JA : Acide jasmonique

K

KO : "Knock-out"

L

LHC : "Light harvesting complex"

LN : "Low nitrate" (Limitation en nitrate)

M

MC : Métacaspase

MeJA : Méthyl jasmonate

MES : "Methylesterase"

MF (FM) : Matière fraîche ("Fresh matter")

MMP : "Matrix metalloproteinase"

MP : Métalloprotéase

MPP : "Mitochondrial processing-peptidase"

MS (DM) : Matière sèche ("Dry matter")

N

N : "Nitrogen", Azote

NBI : "Nitrogen balance index"

NBPT : N-(n-butyl) thiophosphoric triamide

NiR : Nitrite réductase

NPC : "No probe control"

NR : Nitrate réductase

O

O₂^{•-} : Anion superoxyde

OH[•] : Hydroxyle

P

PAE : "Pectinacetylerase"

PAR : "Photosynthetically Active Radiation"

PCD : "Programmed cell death" (Mort cellulaire programmée)

PLCP : "Papain-like cysteine protease"

POPL : "Prolyloligopeptidase-like protease"

PQL : "Protein quantitative loci"

PS : Photosystème

PVDF : Polyvinylidene difluoride

PVPP :

Polyvinylpyrrolidone

Q

QTL : "Quantative trait loci"

R

RAPSODYN : "Optimisation of the rapeseed oil content and yield under low nitrogen input: improving breeding of adapted varieties using genetics and genomics"

RBC : RuBisCO, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase

RBCL : "Large sub-unit of RBC (Grande sous-unité de la RuBisCO)"

RBCS : "Small sub-unit of RBC (Petite sous-unité de la RuBisCO)"

RCB : "Rubisco containing bodies"

ROS : "Reactive oxygen species" (Espèce réactive de l'oxygène)

S

SA : Acide salicylique

SAG : "Senescence associated gene"

SAP : "Senescence associated protease"

SAV : "Senescence associated vesicle"

SCPL : "Serine carboxypeptidase-like protein"

SD : "Standard deviation" (Ecart-type)

SDG : "Senescence down-regulated gene"

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE : "SDS polyacrylamide gel electrophoresis"

SE : "Standard error" (Erreur standard)

SH : "Serine hydrolase" (Hydrolase à sérine)

SL : Strigolactones

SOD : Superoxyde dismutase

SP : "Serine protease" (Protéase à serine)

SPAD : "Soil plant analysis development"

Sub-L (S8) : "Subtilisin-like"

T

TBS : "Tris buffer saline"

TBST : TBS tween 20

TCN : Teneur critique en azote

TP : Protéase à thréonine (Protéasome)

U

Ub : Ubiquitine

UCN : Université de Caen Normandie

UPLC : "Ultra-high performance liquid chromatography"

UPS : "Ubiquitin 26S-proteasome system"

UV : Ultraviolet

V

VPE : "Vacuolar processing enzyme"

W

WAF : "Week after flowering"

WSCP : "Water soluble chlorophyll binding"

WT : "Wild type"

Sommaire

Chapitre A : Introduction générale	1
Chapitre B : Synthèse bibliographique	5
B.I. Gestion de l'azote lors de la culture du colza d'hiver	5
B.I.1. Du semis au stade cotylédonnaire (stade A)	5
B.I.2. De la formation de la rosette à la reprise de végétation (stade B)	6
B.I.3. De la reprise de végétation en sortie d'hiver jusqu'à la floraison (stades C-D-E)	7
B.I.4. De la floraison à la maturité des graines (stades F-G)	7
B.II. Vers l'amélioration de l'Efficiences d'Usage de l'Azote (EUA) chez le colza	8
B.II.1. Définitions et composantes de l'EUA	8
B.II.2. Amélioration de l'EUA via une optimisation des pratiques culturales	9
<i>B.II.2.a Mesurer l'état nutritionnel de la plante afin d'optimiser les apports en N</i>	9
<i>B.II.2.b Optimiser les itinéraires techniques</i>	11
B.II.3. Amélioration de l'EUA via une optimisation de la composante EAbA : l'Efficiences d'Absorption de l'Azote	12
B.II.4. Amélioration de l'EUA via une optimisation de la composante EUtA : l'Efficiences d'Utilisation de l'azote	14
<i>B.II.4.a La sous-composante EAA : l'Efficiences d'Assimilation de l'Azote</i>	14
<i>B.II.4.b La sous-composante ERA : l'Efficiences de Remobilisation de l'Azote</i>	15
B.III. La sénescence et la remobilisation des composés azotés	18
B.III.1. La sénescence : Définition et importance pour le rendement	18
B.III.2. Modifications physiologiques, biochimiques et moléculaires associées à la sénescence foliaire	20
<i>B.III.2.a L'initiation de la sénescence</i>	20
<i>B.III.2.b La dégradation et le recyclage des éléments cellulaires</i>	21
<i>B.III.2.c La phase terminale</i>	22
B.III.3. La sénescence : un processus fortement régulé	23
<i>B.III.3.a Les facteurs environnementaux régulant la sénescence : stress abiotiques et biotiques</i>	23
<i>B.III.3.b Les facteurs endogènes (sucres et ROS)</i>	25
B.III.3.b.1 Les sucres (ratio C/N)	25
B.III.3.b.2 Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)	26
<i>B.III.3.c Les phytohormones</i>	26
B.III.3.c.1 Les phytohormones régulant négativement la sénescence	27
B.III.3.c.2 Les phytohormones régulant positivement la sénescence	28
B.IV. La protéolyse et la remobilisation du N pendant la sénescence	30
B.IV.1. Les principales protéines source de N	30
B.IV.2. Les acteurs de la protéolyse : Les protéases	32
<i>B.IV.2.a Les exopeptidases (exoP)</i>	32
<i>B.IV.2.b Les protéases à cystéine (CPs)</i>	33
B.IV.2.b.1 Les PLCPs	33
B.IV.2.b.2 Les «vacuolar processing enzymes» (VPEs) et les métacaspases (MCs)	34
B.IV.2.b.3 Localisation sub-cellulaire des CPs	34
<i>B.IV.2.c Les protéases à sérine (SPs)</i>	35
B.IV.2.c.1 Les subtilisin-like protéases (Sub-L)	35
B.IV.2.c.2 Les protéases caséinolytiques (Clp)	36
B.IV.2.c.3 Les « dégradation of periplasmic proteins » (Deg)	37
B.IV.2.c.4 Localisation sub-cellulaire des SPs	37
<i>B.IV.2.d Les protéases à aspartate (APs)</i>	38
<i>B.IV.2.e Les métalloprotéases (MPs)</i>	39
B.IV.2.e.1 Les « Filamentation temperature-sensitive H » (FtsH)	39
B.IV.2.e.2 Les «Mitochondrial processing-peptidases» (MPPs)	40
B.IV.2.e.3 Les «Matrix métalloprotéinases» (MMPs)	40
B.IV.2.e.4 Localisation subcellulaire des métalloprotéases	41
<i>B.IV.2.f Les protéases à thréonine : le protéasome (TPs)</i>	41

B.IV.3. Compartimentation protéines/protéases et trafic vésiculaire associé à la protéolyse	43
B.IV.4. La régulation des activités protéasiques	44
B.V. Problématique et Objectifs de recherche	45
Chapitre C: Matériels et Méthodes	49
C.I. Conditions de culture et dispositifs expérimentaux	49
C.I.1. Culture en conditions contrôlées de 3 génotypes de colza au stade rosette (Articles 1 et 2)	49
C.I.2. Culture en conditions contrôlées de 2 génotypes de colza au stade cotylédonaire (Article 3)	50
C.I.2.a Etude de la sénescence des cotylédons en conditions HN et LN	51
C.I.2.b Etude de l'effet de l'application de phytohormones sur la sénescence cotylédons	51
C.I.3. Culture en conditions contrôlées au stade reproducteur (génotype Aviso) (Article 4)	52
C.II. Mesure de l'état physiologique de la plante	53
C.II.1. Mesure de la biomasse et de la surface foliaire	53
C.II.2. Mesure de la teneur relative en chlorophylles et en anthocyanes	53
C.II.2.a La pince SPAD	53
C.II.2.b Le Multiplex®	53
C.III. Méthodes d'analyses élémentaires et biochimiques	54
C.III.1. Détermination des quantités de N total et de ¹⁵ N	54
C.III.2. Détermination des teneurs en phytohormones	55
C.IV. Méthodes d'analyses protéomiques	56
C.IV.1. Méthodes d'analyses quantitatives et qualitatives des protéines solubles	56
C.IV.1.a Extraction et dosage des protéines solubles	56
C.IV.1.b Transfert sur membrane PVDF (« Western blotting ») et immunodétection	56
C.IV.2. Etudes des activités protéolytiques	57
C.IV.2.a Dégradation <i>in vitro</i> de la RuBisCO sur gel « stain-free » en présence ou absence d'inhibiteurs de classes de protéases spécifiques	58
C.IV.2.b Mesure des activités protéasiques via l'utilisation de sonde «activité-dépendantes»	59
C.IV.2.b.1 Détection des activités protéasiques via l'utilisation de sondes fluorescentes	60
C.IV.2.b.2 Purification et identification des protéases actives via l'utilisation de sonde « activité-dépendantes » couplées à un résidu biotine	62
C.V. Méthodes d'analyses statistiques	65
Chapitre D : Résultats	66
D.I. Characterization of senescence-associated protease activities involved in the efficient protein remobilization during leaf senescence of winter oilseed rape	66
D.I.1. Introduction	68
D.I.2. Materials and methods	70
D.I.2.a Chemicals	70
D.I.2.b Plant material and growth conditions	71
D.I.2.c Protease activity associated with degradation of RuBisCO (RBCL)	71
D.I.2.d Protease activity profiling of extracts	72
D.I.2.e Statistical analysis	74
D.I.3. Results and Discussion	74
D.I.3.a Leaf senescence and soluble protein degradation	74
D.I.3.b Senescence-associated protease (SAP) activities in oilseed rape leaves	76
D.I.3.b.1 Aspartic proteases (APs)	76
D.I.3.b.2 The proteasome	76
D.I.3.b.3 Serine proteases (SPs)	77
D.I.3.b.4 Cysteine proteases (CPs): PLCPs and VPEs	80
D.I.4. Concluding remarks	82

D.II. Characterization of proteolytic machinery associated with the senescence of silique walls and the nitrogen remobilization efficiency of <i>Brassica napus</i> L.	84
D.II.1. Introduction	86
D.II.2. Materials and methods	88
D.II.2.a <i>Experimental design</i>	88
D.II.2.b <i>Quantification of N content</i>	89
D.II.2.c <i>Profiling of active proteases</i>	89
D.II.2.d <i>Identification of active proteases</i>	90
D.II.2.e <i>Statistical analysis</i>	91
D.II.3. Results	91
D.II.3.a <i>Changes of N and soluble proteins contents in pericarps and seeds during the different stages of silique development</i>	91
D.II.3.b <i>Protease activity profiles in pericarps during silique senescence</i>	92
D.II.4. Discussion	94
D.II.4.a <i>The N remobilization from pericarps to seeds is associated with protein degradation</i>	94
D.II.4.b <i>Cysteine and serine proteases activities are associated with proteolysis during senescence of pericarps</i>	96
D.II.5. Conclusion	97
D.III. A genotypic comparison reveals that the improvement in nitrogen remobilization efficiency in oilseed rape leaves is related to specific patterns of senescence-associated protease activities and phytohormones	100
D.III.1. Introduction	102
D.III.2. Materials and methods	105
D.III.2.a <i>Chemicals</i>	105
D.III.2.b <i>Experimental design</i>	105
D.III.2.c <i>Quantification of N and ¹⁵N contents</i>	106
D.III.2.d <i>Profiling of protease activities</i>	106
D.III.2.e <i>Identification of active proteases</i>	106
D.III.2.f <i>Immunodetection of SAG12</i>	108
D.III.2.g <i>Phytohormone measurements</i>	108
D.III.2.h <i>Statistical analysis</i>	108
D.III.3. Results and Discussion	109
D.III.3.a <i>Physiological and biochemical changes associated with senescence for Ténor vs Samourai</i>	109
D.III.3.b <i>Leaf senescence-associated protease (SAP) activities for Ténor vs Samourai</i>	110
D.III.3.c <i>Phytohormone contents during leaf senescence in Ténor vs Samourai</i>	115
D.III.4. Concluding remarks	117
D.IV. The senescence of cotyledons: a model to explore the genotypic variability of Proteolysis machinery and their regulation associated with the nitrogen remobilization efficiency during leaf senescence of <i>Brassica napus</i> L.	126
D.IV.1. Introduction	128
D.IV.2. Materials and methods	130
D.IV.2.a <i>Chemicals</i>	130
D.IV.2.b <i>Experimental design</i>	130
D.IV.2.b.1 <i>Study of the senescence of the cotyledons under high N or low N conditions</i>	130
D.IV.2.b.2 <i>Effect of the phytohormone infiltrations on the senescence of cotyledons</i>	131
D.IV.2.c <i>Detection and identification of active proteases</i>	131
D.IV.2.d <i>Statistical analysis</i>	133
D.IV.3. Results and Discussion	133
D.IV.3.a <i>Characterization of physiological and proteolysis events during the senescence of cotyledons in two genotypes of oilseed rape with contrasted NRE</i>	133
D.IV.3.a.1 <i>Physiological modifications during the senescence of cotyledons</i>	133
D.IV.3.a.2 <i>Modifications of protease activities during the senescence of cotyledons</i>	134
D.IV.3.b <i>Phytohormonal regulation of proteases activity during senescence in cotyledons</i>	136

D.IV.3.b.1 Effects of ABA infiltrations of the senescence of cotyledons	137
D.IV.3.b.2 Effects of SA infiltrations of the senescence of cotyledons of Ténor	137
D.IV.4. Conclusion	138
Chapitre E : Discussion générale & Perspectives	146
E.I. Caractérisation de la machinerie protéolytique impliquée dans la remobilisation efficiente du N chez le colza	147
E.I.1. Mise en évidence des activités protéasiques impliquées dans la remobilisation du N lors de la sénescence foliaire aux stades végétatifs	147
E.I.2. Mise en évidence des activités protéasiques impliquées dans la remobilisation du N lors de la sénescence des siliques	151
E.I.3. Perspectives à envisager afin d'améliorer l'ERA aux stades végétatifs et reproducteurs	152
E.II. Etude préliminaire de la régulation hormonale des protéases associées à la sénescence	155
E.III. Peut-on utiliser la sénescence des cotylédons comme modèle d'étude de la sénescence foliaire chez le colza ?	157
E.III.1. Les modifications physiologiques et protéolytiques associées à la sénescence des cotylédons et à la sénescence foliaire sont similaires	158
E.III.2. Certaines protéases associées à une meilleure ERA chez Ténor lors de la sénescence foliaire sont déjà identifiées lors de la sénescence des cotylédons	159
E.III.3. Exemple d'utilisation du cotylédon comme modèle expérimental pour étudier la sénescence foliaire : régulation phytohormonale des activités protéasiques	160
E.III.4. Utilisation des cotylédons : les perspectives à envisager	161
Chapitre F : Références bibliographiques	163
Annexes	192

Chapitre A
Introduction générale



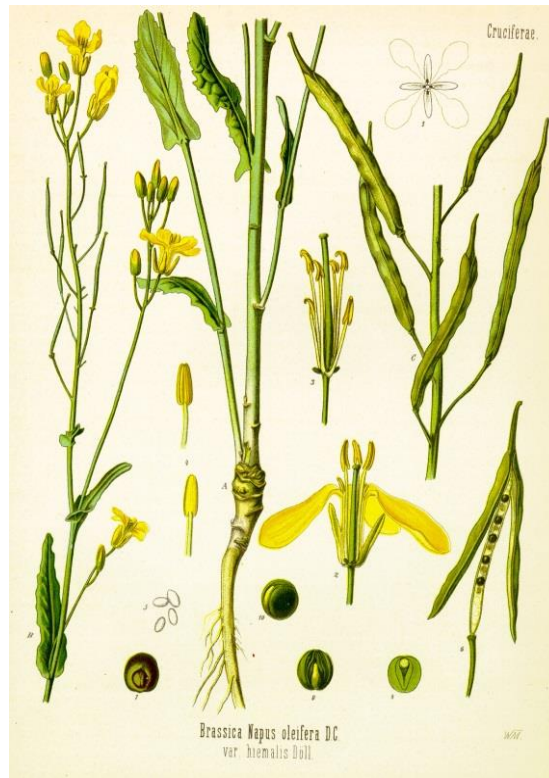


Figure A-1: Planche botanique de colza d'hiver *Brassica napus* L. issu de l'Atlas des plantes médicinales de Köhler (<http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/koehler/RAPS.jpg>).

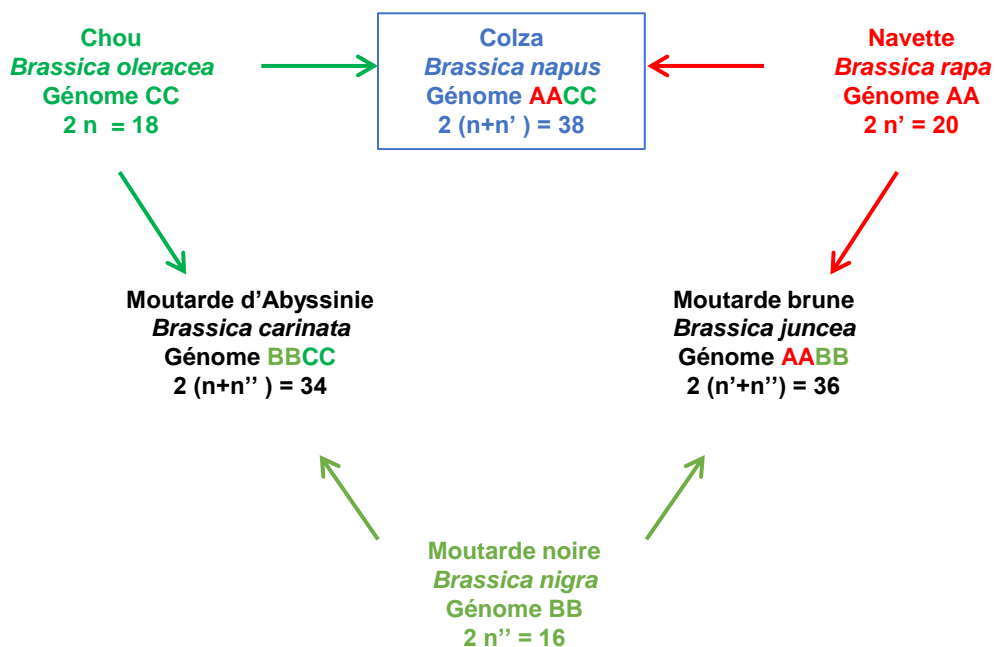


Figure A-2: Triangle de U représentant les relations génétiques entre les différentes espèces de Brassicacées. A, B et C représentent les différents génomes et n représente le nombre de chromosomes (d'après U, 1935).

Chapitre A : Introduction générale

Le colza : la culture, les débouchés et les problématiques associées à la gestion de l'azote

Le colza, *Brassica napus* L., appartient à la famille des Brassicacées (**Figure A-1**). Cette plante herbacée est issue d'un croisement ancestral entre la navette (*Brassica rapa* L.) et le chou (*Brassica oleracea* L.) ayant eu lieu plusieurs milliers d'années avant J.-C (**Figure A-2**). Les premières attestations de l'existence de la culture de colza sont mentionnées dans divers textes hollandais datés de 1366 et 1421 avec l'utilisation des termes « koolsaet » (graine de chou, origine du mot « colza ») et « van rapen » (graine de colza, origine du terme « rape »). En France, ce n'est qu'après 1750 que le colza va se substituer progressivement à la navette (Enquête du Service de la statistique générale de France, source cartographique Articque). Il existe deux variétés de colza : le colza d'hiver cultivé majoritairement en Europe (cycle de 250-310 jours) et le colza de printemps cultivé principalement au Canada et en Australie (cycle de 120-130 jours).

Etant la seconde culture oléagineuse derrière le soja (Carré et Pouzet, 2014) avec une production mondiale d'environ 64 millions de tonnes de graines, la culture de colza connaît un regain d'intérêt grâce à de nombreux débouchés agro-alimentaires et industriels (**Figure A-3**). En effet, après trituration des graines, l'huile brute obtenue peut être directement utilisée pour l'alimentation. Cette huile peut également subir plusieurs processus de raffinage consécutifs. L'huile semi-raffinée est utilisée dans de nombreux domaines tels que (i) la chimie verte permettant la production de lubrifiants, de détergents, de produits cosmétiques ou de bioplastiques ou (ii) pour la production de biocarburants. Les graines des variétés de colza utilisées dans ces domaines non-alimentaires sont sélectionnées afin de produire une huile riche en certains acides gras tels que l'acide érucique, l'acide oléique ou l'acide α -linoléique. Après un second processus de raffinage, l'huile raffinée est utilisée directement dans l'alimentation humaine ou après transformation dans l'industrie agroalimentaire (production de margarine...). Les graines des variétés de colza utilisées pour l'alimentation humaine contiennent en moyenne 43% de lipides menant à la production d'une huile composée à 58% d'acide oléique, à 22% d'acide linoléique (appartenant au groupe des oméga 6), à 9% d'acide α -linoléique (groupe des oméga 3) et à 11% d'acide palmitique (Nési *et al.*, 2008, www.terresunivia.fr). De par sa composition en acide gras présentant un faible ratio $\omega 6/\omega 3$, cette huile alimentaire est excellente pour la consommation humaine et participe à la réduction des risques de maladies coronariennes ou de certains cancers (ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail ; Foster *et al.*, 2009 ; Cho *et al.*, 2010).

En parallèle, le résidu obtenu après trituration de l'huile est utilisé dans l'alimentation animale (porcs, ruminants et volailles) *via* la production de tourteaux (**Figure A-3**). Le tourteau

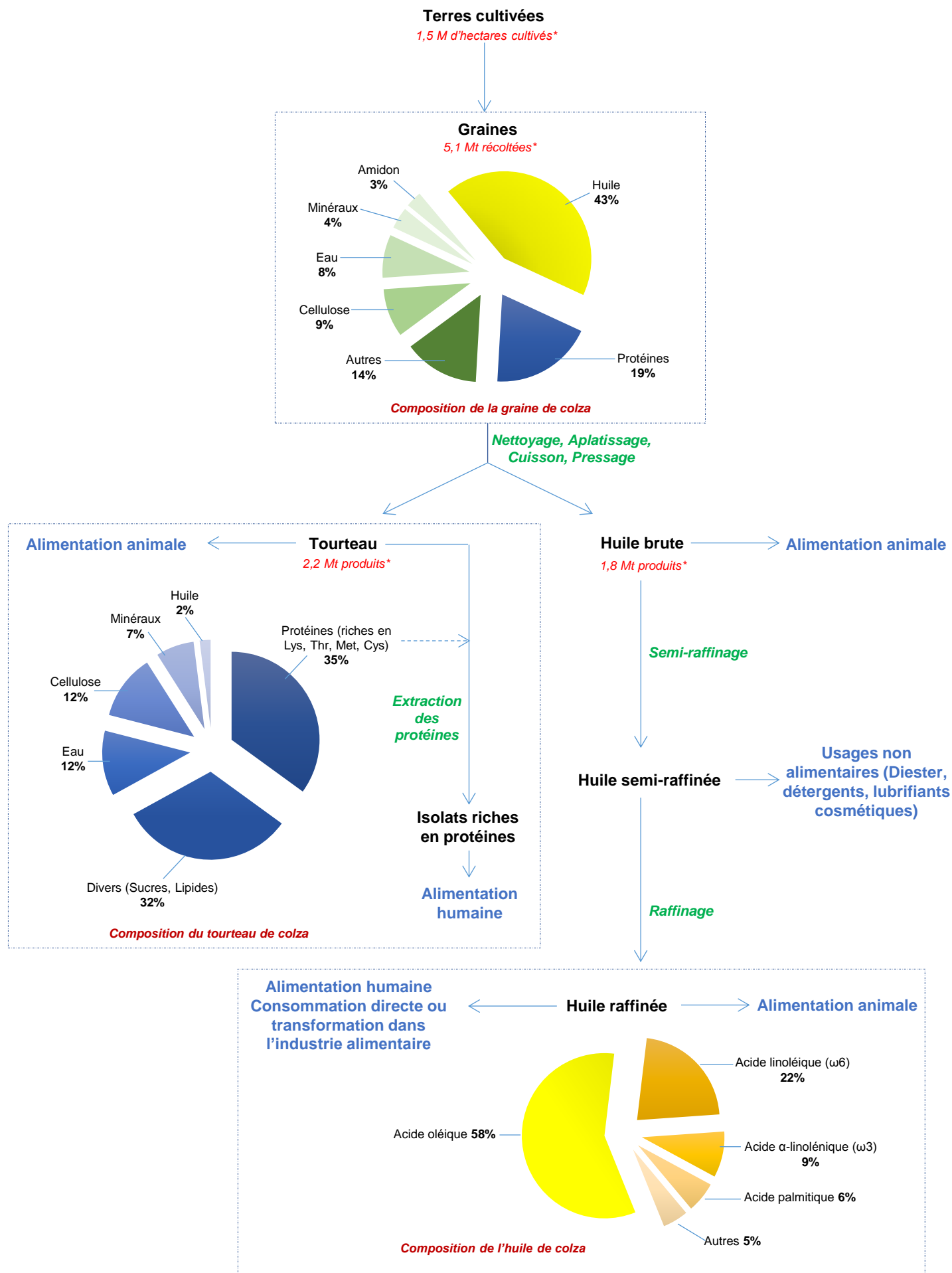


Figure A-3: Utilisations de la graine de colza dans l'industrie alimentaire et non alimentaire. Les compositions de la graine, du tourteau et de l'huile de colza sont représentées. Les chiffres indiqués en rouge* correspondent à une moyenne entre 2010 et 2014 en France. (figure constituée à partir de données issues de Nési *et al.*, 2008 ; Von Der Haar *et al.*, 2014 ; www.terresunivia.fr ; www.terresinovia.fr).

de colza est riche en protéines possédant des acides aminés essentiels, non synthétisés par les animaux, tel que la méthionine, la thréonine ou encore la lysine. De par cette composition riche en protéines couplée à une forte teneur en minéraux, l'apport de tourteau de colza permet d'améliorer la qualité du lait de vache ou la production de la viande de veau et d'agneau (Papas *et al.*, 1979 ; Solomon *et al.*, 1991). Le tourteau de colza est devenu depuis plusieurs années une très bonne alternative au tourteau de soja d'importation pour l'alimentation animale. De plus, les protéines extraites du tourteau peuvent être utilisées dans l'alimentation humaine. En effet, de nouvelles techniques d'extraction permettent la production d'isolats avec des teneurs en protéines de plus de 90% présentant des saveurs optimisées (Von Der Haar *et al.*, 2014). L'utilisation de ces protéines en remplacement des protéines animales dans divers aliments tels que les mayonnaises ou les plats contenant des protéines d'œufs (alimentation végétarienne/végétalienne) correspond à un nouveau débouché très prometteur pour le colza (Figure A-3).

Les variétés de colza ont été particulièrement sélectionnées, dès les années 1970, afin de répondre aux exigences de qualité nutritionnelle requises pour l'alimentation humaine et animale. En effet, les graines des variétés traditionnelles de colza produisaient une huile trop riche en acide érucique, un acide gras toxique à forte dose pour l'homme et l'animal (Hung *et al.*, 1977), et en glucosinolates, molécule soufrée conférant au tourteau de colza une inappétence et une toxicité reconnue pour les animaux (Mawson *et al.*, 1993 ; 1994a-b ; Walker et Booth, 2001). Dans le but de s'affranchir de ces deux molécules réduisant les débouchés alimentaires des graines de colza, la sélection variétale a permis la production de variétés de colza dites « simple zéro » (ou « Canola » pour Canadian oil low acid) dont les graines présentent une teneur en acide érucique inférieur à 2% de la fraction lipidique de la graine ainsi que des variétés dites « double zéro » (Double low : low erucic acid and low glucosinolate) présentant une faible teneur en acide érucique et une teneur en glucosinolates inférieure à 20 µmoles par gramme de graine (Nési *et al.*, 2008).

En plus de ces débouchés économiques, la culture de colza présente des intérêts aux niveaux des systèmes de culture. En effet, le colza est une espèce dite CIPAN (culture intermédiaire piège à nitrate) qui présente une forte absorption de l'azote (N). Son utilisation en inter-culture permet de limiter la dégradation des sols, la pollution nitrique des nappes phréatiques et le rejet atmosphérique de composés azotés gazeux à effet de serre (GES) tels que le protoxyde d'azote.

Les nombreux débouchés de la culture de colza, le perfectionnement des méthodes de trituration et les progrès de la sélection variétale ayant conduit à l'amélioration du rendement et de la qualité grainière ainsi qu'à une meilleure résistance à certaines maladies, expliquent

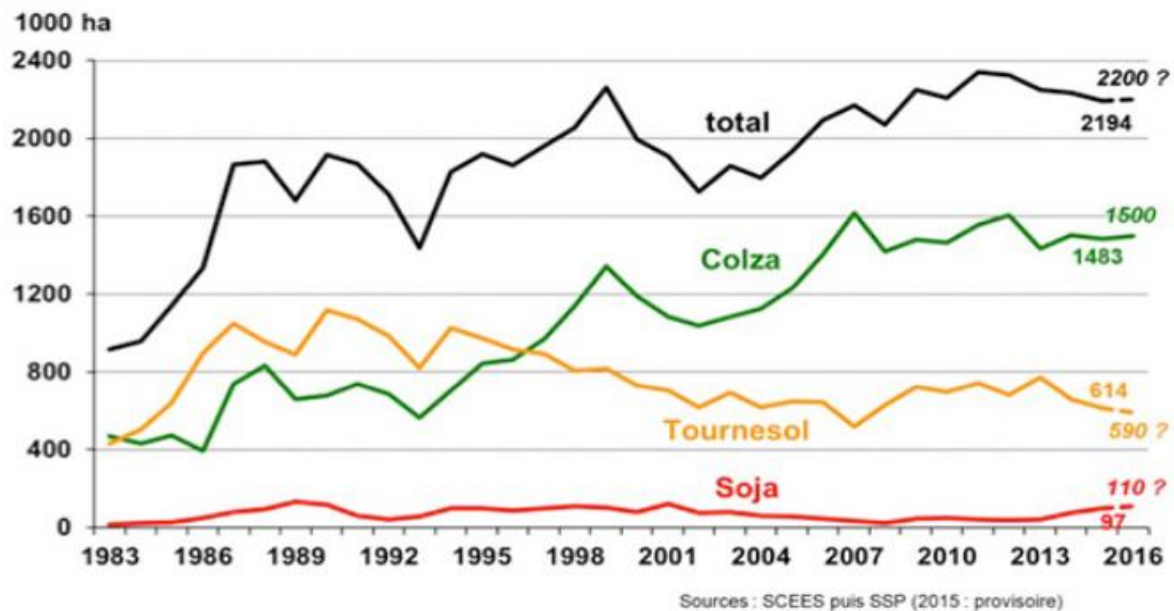


Figure A-4: Surfaces des cultures d'oléagineux (Colza, Tournesol et Soja) en France de 1983 à 2016. Les données présentées sont provisoires pour 2015 et 2016. D'après www.terresunivie.fr.

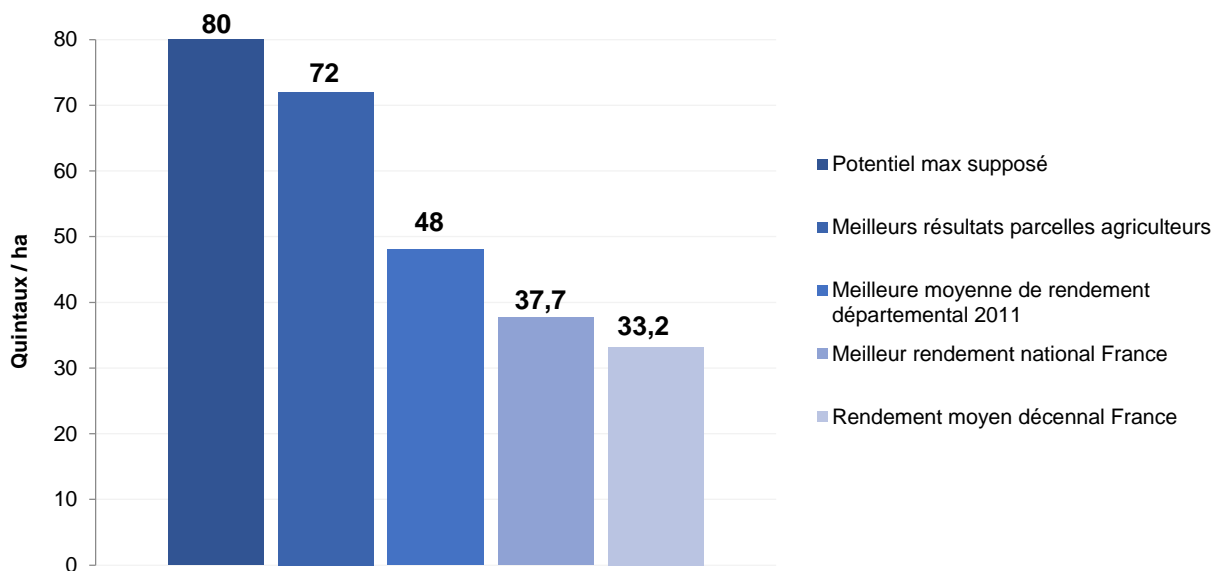


Figure A-5: Comparaisons de différents niveaux de rendement maximum de colza estimés ou observés en plein champ en France. D'après Hebinguer, 2013.

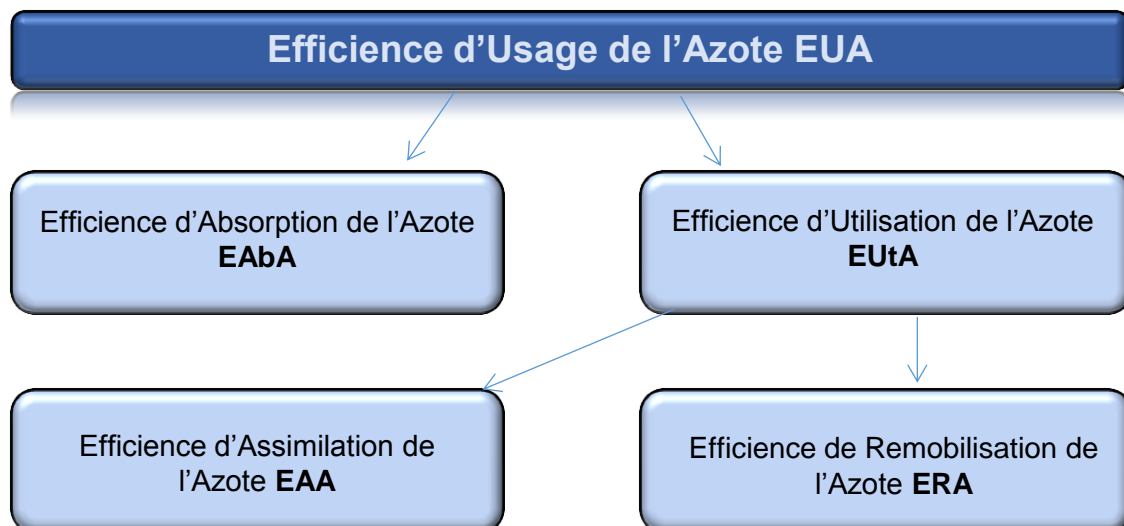


Figure A-6: Définitions des différentes composantes de l'Efficacité d'Usage de l'Azote (EUA) (D'après Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010).

l'expansion de la culture depuis les années 1990 notamment en France. En effet, les superficies cultivées ont augmenté constamment, jusqu'à atteindre 1,5 millions d'hectares (**Figure A-4**) (valeur moyenne de 2010 à 2014 ; www.terresunivivia.fr). Ceci aboutit à une production de 5,1 millions de tonnes de graines, 1,8 millions de tonnes d'huile et 2,2 millions de tonnes de tourteaux de colza soit 26% des tourteaux utilisés dans l'alimentation animale en France (**Figure A-3** ; valeur moyenne de 2010 à 2014 ; www.terresunivivia.fr). Par ailleurs, l'Union Européenne est le premier producteur mondial de colza avec une production annuelle de 20 Mt de graines contre 15 Mt pour le Canada ou 12 Mt en Chine. Néanmoins, le rendement agricole moyen actuellement observé reste encore éloigné du potentiel de l'espèce (**Figure A-5** ; [Hebinger, 2013](#)), suggérant que le potentiel de rendement du colza puisse être fortement amélioré.

Malgré sa forte capacité d'absorption de l'azote minéral, la culture de colza nécessite une quantité importante d'engrais azotés afin d'obtenir une production suffisante (160-250 kg.ha⁻¹ ; [Rathke et al., 2005](#)). A titre d'exemple, la culture de colza nécessite en effet 7 kg de N par quintal de graines produit contre seulement 3 kg pour la culture de blé tendre (www.terresinovia.fr ; www.arvalis-infos.fr).

Pour améliorer le bilan agroenvironnemental et la compétitivité de la culture de colza vis-à-vis des autres oléoprotéagineuses, l'un des défis majeurs sera d'optimiser le rendement grainier tout en limitant les intrants azotés qui constituent le poste de dépense le plus important des cultures ([Rothstein, 2007](#)) et présentent des risques pour l'environnement en cas de lessivage du nitrate (pollution des nappes phréatiques, risque d'eutrophisation et de dystrophisation) ou de production de GES (protoxyde d'azote).

Or, en plus de sa forte exigence en intrants azotés, le colza est caractérisé par une faible Efficience d'Usage de l'Azote (EUA). En effet, seulement 50 % N apporté par les fertilisants est retrouvé dans les graines de colza ([Schjoerring et al., 1995](#)). L'EUA correspond au rapport entre la quantité de matière sèche produite (rendement grainier pour le colza) et la quantité de N disponible dans le sol. Elle est subdivisée en 2 composantes : l'Efficience d'Absorption de l'Azote (EAbA) et l'Efficience d'Utilisation de l'Azote (EUtA) (**Figure A-6**, [Masclaux-Daubresse et al., 2010](#)). Le colza étant une CIPAN, l'absorption du N ne semble pas être la composante qui limite l'EUA. Les travaux actuels se focalisent donc sur l'amélioration de l'utilisation du N soit la composante EUtA qui est elle-même constituée de 2 sous-composantes : l'Efficience d'Assimilation de l'Azote (EAA) et l'Efficience de Remobilisation de l'Azote (ERA). Il a par ailleurs été démontré que la faible EUA chez le colza serait due en grande partie à une mauvaise remobilisation des composés azotés foliaires pendant la sénescence au cours des stades

végétatifs et de la transition stade végétatif / stade reproducteur en affectant directement le rendement (Malagoli *et al.*, 2005a-b ; Girondé *et al.* 2015b). Les travaux actuels se focalisent donc sur l'optimisation de la composante ERA dans le but d'améliorer l'EUA (Avice et Etienne, 2014).

Dans ce contexte, ce travail de thèse a pour objectif de **caractériser les mécanismes protéolytiques associés à une remobilisation efficace des composés azotés dans l'optique d'optimiser l'ERA chez le colza.**

Bénéficiant d'une allocation du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, mes travaux de recherche doctorale sont pleinement inscrits dans le programme Investissement Avenir RAPSODYN¹ (2012-2019) qui vise à optimiser la teneur et le rendement en huile chez le colza cultivé sous contrainte azotée dans le but d'assurer la compétitivité à long terme de la production de colza.

Après une synthèse bibliographique des connaissances relatives à la gestion du N par le colza, à la sénescence et aux modifications biochimiques et moléculaires associées à la remobilisation de l'azote (Chapitre B), les dispositifs expérimentaux et les méthodes d'analyses seront décrits dans le Chapitre C. Les résultats seront ensuite présentés sous la forme de 4 articles (Chapitre D) suivi par une discussion générale permettant de discuter les résultats de façon plus globale, d'évaluer les retombées et de proposer des perspectives (Chapitre E).

¹ ANR-11-BTBR-004 RAPSODYN – Investments for the future : Optimisation of the RAPeSeed Oil content and Yield under low Nitrogen input

Chapitre B
Synthèse bibliographique
& Objectifs



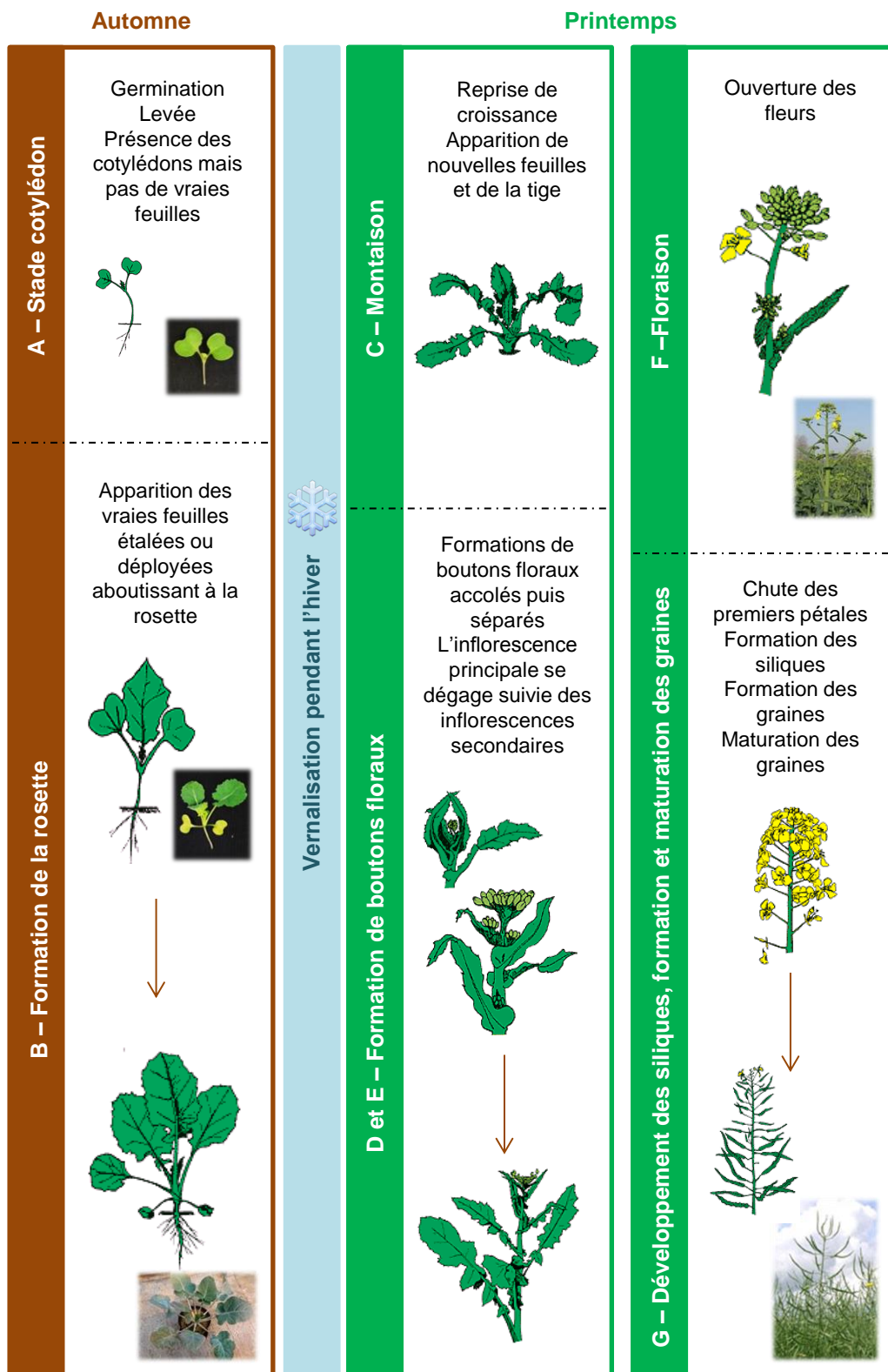


Figure B-1: Les 7 stades repères (stades A à G) du cycle de développement du colza d'hiver. Figure modifiée et simplifiée d'après Hebingner (2013) et www.terresinovia.fr.

Chapitre B: Synthèse bibliographique

B.I. Gestion de l'azote lors de la culture du colza d'hiver

L'azote (N) est l'un des éléments les plus essentiels à la croissance et au développement des plantes. Il correspond à un élément majeur nécessaire à la formation de composés azotés cruciaux pour la plante tels que les chlorophylles, les bases azotées retrouvées dans les acides nucléiques (ADNs et ARNs) ou encore les acides aminés participant à la synthèse des protéines et peptides (Tegeder et Rentsch, 2010). De plus, une limitation en N minéral a des conséquences sévères sur la croissance et le métabolisme des plantes (Epstein et Bloom, 2005) et *in fine* sur le rendement et la qualité des produits récoltés. C'est pour cela que dans les années 1980, les doses de N apportées ont considérablement augmenté atteignant 200 à 250 kg N/ha afin d'augmenter le rendement du colza dans un contexte de croissance importante de la population (Hebinger, 2013).

Néanmoins, malgré un fort besoin en fertilisants azotés (Ratkhe *et al.*, 2005), seulement 50% du N apporté est retrouvé dans les graines de colza (Schjoerring *et al.*, 1995). Le reste du N retourne au sol via la chute des feuilles et l'enfouissement des organes non récoltés. Ce retour de N vers l'environnement (Billen *et al.*, 2013 ; Lassaletta *et al.*, 2014) pourra éventuellement être valorisé pour la culture suivante mais conduira le plus souvent à augmenter les risques de pollution *via* des phénomènes de lessivage du N en excès (risque d'eutrophisation) ou la libération dans l'atmosphère de protoxyde d'azote (GES) après intervention des bactéries du sol.

Afin d'améliorer le bilan agro-environnemental du colza, il est nécessaire de mieux comprendre la gestion du N au cours de son cycle de développement afin d'optimiser l'apport d'intrants azotés coûteux et polluants (Tilman *et al.*, 2002) et d'améliorer l'usage du N par le colza. Le cycle de développement du colza peut être divisé en 7 stades repères (**Figure B-1**) : Le stade cotylédonnaire (A), le stade de formation de la rosette (B), le stade montaison (C), le développement des bourgeons floraux tout d'abord accolés puis séparés (stades D et E), le stade floraison (F) puis le stade de développement des siliques et de formation et maturation des graines (G).

B.I.1 Du semis au stade cotylédonnaire (stade A)

En France, les graines de colza d'hiver sont généralement semées de la mi-août à fin septembre avec une implantation optimale de 30 à 60 graines par m². Ces graines de petites tailles (2 à 3 mm de diamètre) ne possèdent pratiquement pas de dormance primaire et la germination se produit rapidement après semis (72h) avec l'émergence de la radicule (Lunn *et al.*, 2003). Durant ce stade cotylédonnaire, l'humidité du sol est le seul facteur limitant, pouvant provoquer une perte de 95% des plantes viables lorsque le stress hydrique survient au stade

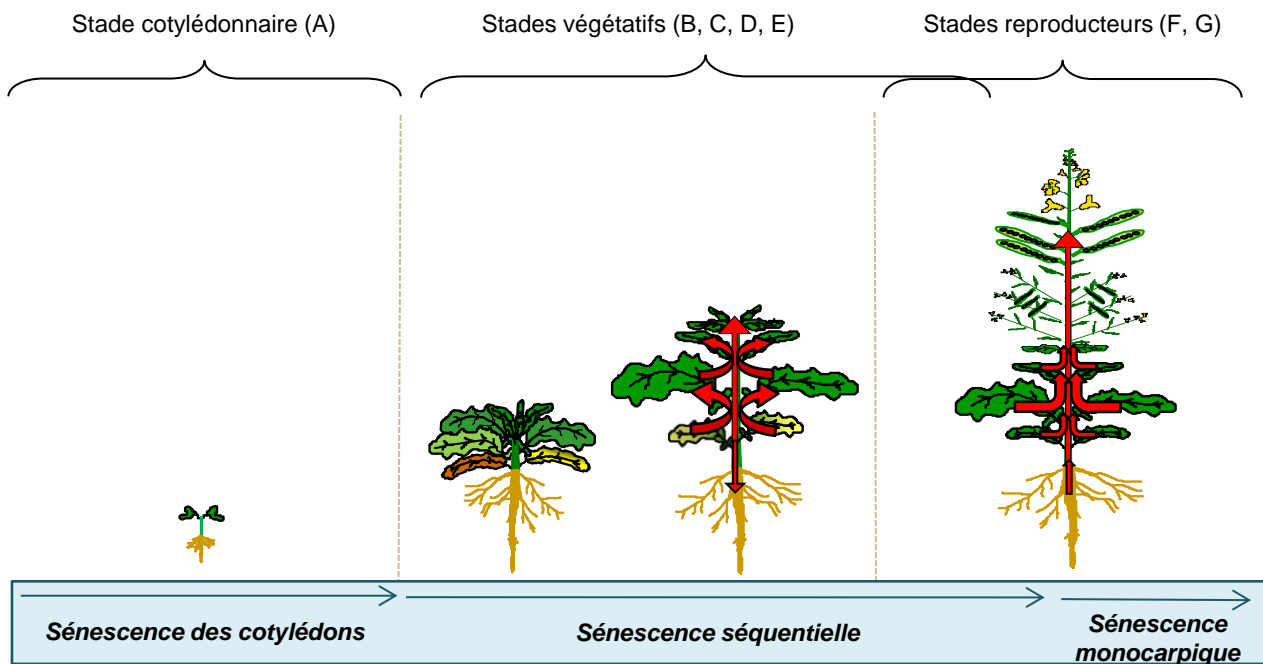


Figure B-2: Les différents types de sénescence se manifestant au cours du cycle de développement du colza.

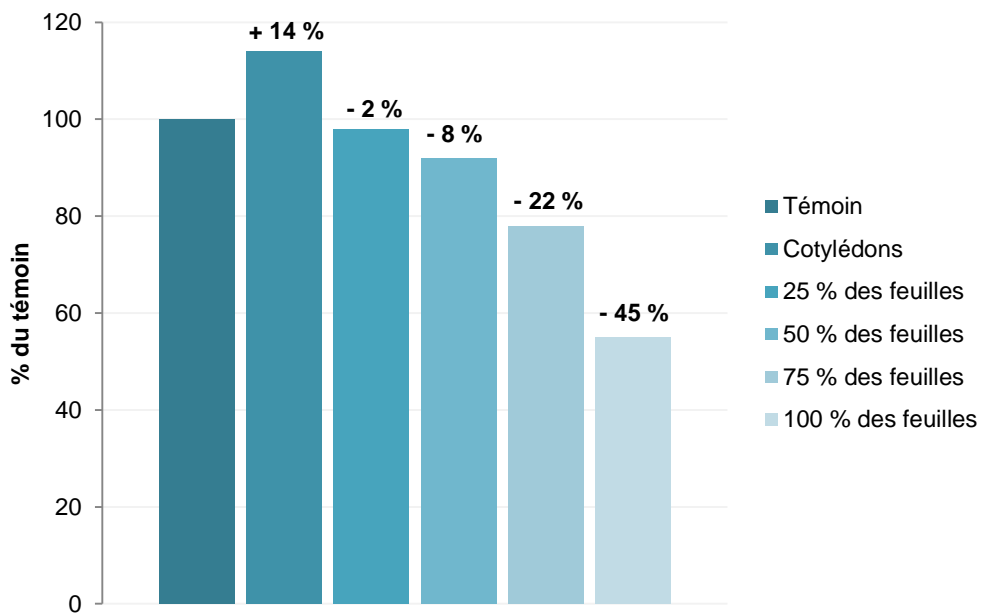


Figure B-3: Impact sur le rendement final du colza de l'ablation à l'automne des cotylédons et d'un pourcentage variable de feuilles. Les données sont exprimées en pourcentage du témoin. Ces essais ont été réalisés entre 1979 et 1982 en Allemagne. Les moyennes ont été établies sur la base de 2 à 11 essais. Figure modifiée d'après [Hebinger \(2013\)](#).

cotylédonaire (McWilliams *et al.*, 1998). L'azote du sol étant considéré comme suffisant à ces stades précoces, aucun apport en N n'est préconisé. De plus, aucune information ne permet de définir la gestion du N chez le colza à ce stade. Il est seulement reconnu qu'après apparition des premières « vraies feuilles », les feuilles cotylédonaire de colza subissent rapidement une sénescence (**Figure B-2**). Cette sénescence est associée à une chute de la teneur en chlorophylles et en protéines pouvant signifier une remobilisation des composés azotés vers les feuilles en croissance chez le colza (Qin *et al.*, 2006).

B.I.2 De la formation de la rosette à la reprise de végétation (stade B)

La rosette de colza est généralement constituée d'une vingtaine de feuilles qui se forment durant l'automne avant la période hivernale. Lors de cette période, le système racinaire se développe et forme le pivot, organe accumulateur de réserves organiques.

L'entrée en repos végétatif de la rosette se manifeste dès lors que la plante subit 5 jours consécutifs de température moyenne journalière inférieure à 5°C (Hebinger, 2013). Lorsque le colza entre en repos végétatif, la croissance ralentit voire s'arrête. Durant cette période, la rosette peut supporter des températures inférieures à 20 °C sans que cela n'affecte le rendement final (Merrien et Pouzet, 1988). Cette période froide et de photopériode courte est essentielle pour la vernalisation du colza qui conditionnera le bon déroulement des stades de développement au printemps (stades C, D, E, F et G).

Durant la période automnale, la forte croissance du colza permet à la plante de constituer des réserves de nutriments, dont de l'azote, qui lui permettront de passer l'hiver et de répondre aux besoins importants en nutriments nécessaires à la reprise de végétation. Durant cette période, la rosette est qualifiée de « pompe à nitrate » de par sa forte capacité à absorber et à stocker le N. Cet élément est par ailleurs essentiellement stocké dans les feuilles où il peut représenter jusqu'à 5% de la matière sèche. L'ablation des feuilles de colza à ce stade peut avoir une répercussion négative sur le rendement final du colza (**Figure B-3**, Hebinger, 2013). Durant la période automnale comme hivernale, l'apport d'engrais azotés est interdit (du 1^{er} septembre au 31 janvier, directive nitrate 91/676/CEE de 1991). Un apport de N durant cette période ne permet pas une augmentation du rendement final (Colnenne *et al.*, 1998) et favorise de surcroît l'élongation automnale de la tige sensibilisant la plante au gel et aux maladies (www.terresinovia.fr).

Simultanément lors de cette période, le N est remobilisé graduellement le long de l'axe de la plante à partir des vieilles feuilles vers les feuilles en croissance *via* le processus de sénescence séquentielle (**Figure B-2**). Néanmoins, les feuilles peuvent chuter avec une forte de teneur en N résiduel pouvant atteindre 2% de la matière sèche (Malagoli *et al.*, 2005a) démontrant ainsi la faible efficacité de la plante à remobiliser le N lors de ces stades végétatifs.

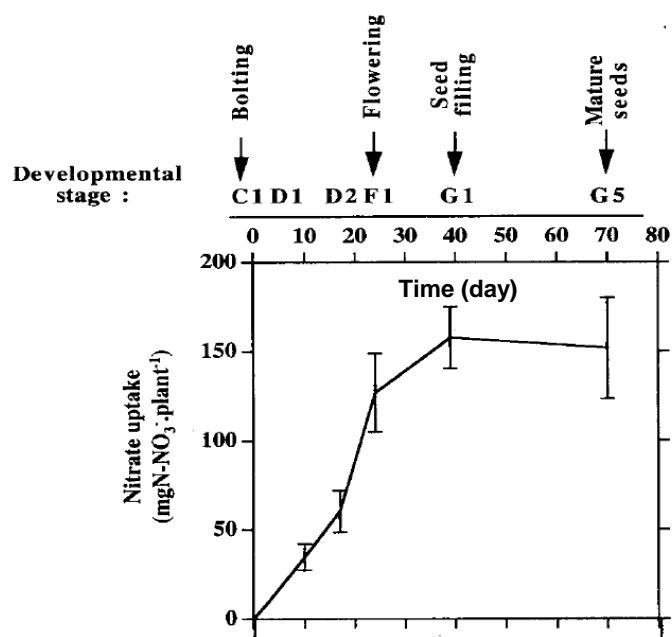


Figure B-4: Accumulation nette du nitrate absorbé par la plante de colza d'hiver (cv. Capitol) pendant la phase de reprise de croissance jusqu'à la maturation des graines. Ces valeurs ont été obtenues via l'utilisation de l'isotope stable ¹⁵N. (D'après [Rossato et al., 2001](#)).

B.I.3 De la reprise de végétation en sortie d'hiver jusqu'à la floraison (stades C-D-E)

La reprise de végétation s'engage à la sortie de l'hiver, en fonction de la date de semis (Tittone *et al.*, 1988), lorsque les températures moyennes journalières dépassent 5°C. Elle se caractérise par l'apparition et la croissance de jeunes feuilles au centre de la rosette puis par la formation d'entre-nœuds rendant la tige principale perceptible. La croissance de la tige et des feuilles augmente rapidement tandis que les axes et inflorescences secondaires apparaissent à l'aisselle des feuilles 100°C/j plus tard (Jullien, 2010). La phase de montaison apparaît dès les mois de mars-avril. De la reprise de croissance et la montaison, la plante va utiliser le N stocké dans les feuilles durant l'automne grâce à des processus de sénescence séquentielle (**Figure B-2**). A cette période, une réduction de la surface foliaire causée par un accident climatique ou autres (passage d'animaux, attaques d'insectes, maladies...) a un impact très négatif sur le rendement final du colza. En effet, Noquet *et al.* (2004) ont démontré qu'une ablation artificielle de 50% des feuilles dans la période de montaison conduisait à une baisse de 30% de la biomasse des siliques et un retard de floraison.

Par ailleurs durant cette période, Rossato *et al.* (2001) ont observé, *via* l'utilisation du traceur isotopique stable ¹⁵N, une très nette absorption du N par la plante avant la floraison (**Figure B-4**). Les plantes sont également capables de réabsorber 40% du N perdu lors de la sénescence séquentielle *via* la chute des feuilles durant l'automne (Dejoux *et al.*, 2000). Cette forte absorption traduit une forte demande de N par les organes en croissance tels que les nouvelles feuilles, les tiges et les inflorescences. C'est lors de cette phase du cycle que l'absorption du N est la plus élevée pouvant atteindre jusqu'à 3-5 kg de nitrate/ha/jour (Hebinger, 2013).

Les apports d'intrants azotés vont être, par ailleurs, différents en fonction de la taille des colzas en sortie d'hiver. Par exemple, pour un colza de taille moyenne (0,8 à 1,6 kg/m²), l'apport de N préconisé par Terres Inovia atteint une dose totale moyenne de 130 à 200 kg/ha répartie en 3 apports : 60-80 kg/ha à la reprise de croissance, 50-100 kg/ha au stade boutons floraux accolés (stade D) et 0-40 kg/ha au stade boutons floraux séparés (stade E) (www.terresinovia.fr). La répartition des apports est de plus en plus préconisée afin d'éviter les pertes par lessivage notamment lors des apports trop importants de plus de 100 kg/ha.

B.I.4 De la floraison à la maturité des graines (stades F-G)

Le stade floraison (stade F) se déroule pendant 4-5 semaines, de la fin mars à mi-mai. Une floraison qui se prolonge est par ailleurs le signe d'un stress subi par la plante qui correspond à une réaction de compensation (Hebinger, 2013). Le stade de formation des siliques jusqu'à maturation des graines (stade G) peut s'étendre de mai à juillet voire août chez le colza d'hiver. Durant ces deux stades, la précocité ou le retard de l'apparition des stades est sous l'influence de

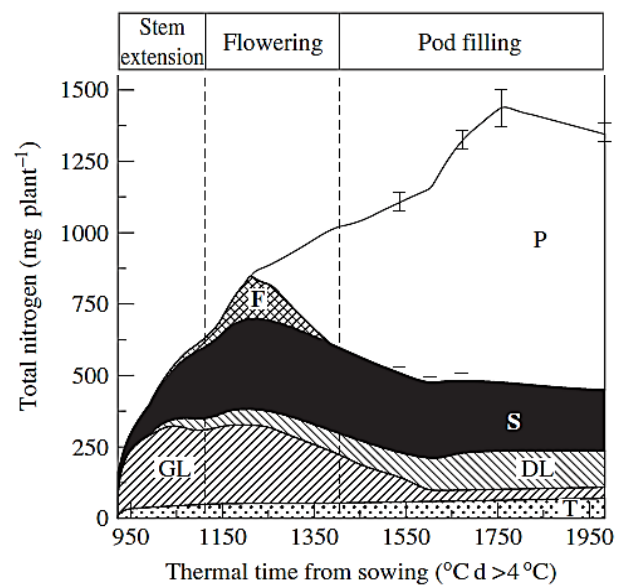


Figure B-5: Cinétique d'accumulation du N total (mg/plante) entre la reprise de végétation et la maturation des graines chez le colza d'hiver (cv. Capitol). T: Racines; GL: feuilles vertes; DL: feuilles mortes; S: tiges; F: fleurs; P: siliques. (D'après [Malagoli et al., 2005a](#)).

différents facteurs tels que le génotype, le climat notamment la photopériode et l'alimentation azotée qui, en limitation ou en excès, accélère l'apparition des stades.

L'apport d'intrants azotés lors des derniers stades (F et G) n'est pas préconisé du fait (i) de la difficulté technique à effectuer ces apports tardifs (le couvert étant très haut), (ii) d'une faible capacité d'absorption du N minéral (**Figure B-4**) qui serait liée à une régulation par des facteurs endogènes (Rossato *et al.*, 2001) et (iii) des risques d'épisodes de sécheresse rendant le N du sol peu disponible en fin de cycle. En conséquence, le N alloué aux parties reproductives provient majoritairement de la remobilisation du N endogène à partir des feuilles (41%), des tiges (31%) et du pivot (11%) (Rossato *et al.*, 2001) *via* des processus de sénescence monocarpique atteignant l'ensemble de la plante en fin de cycle (**Figure B-2**). A la fin de la floraison, les siliques correspondent aux organes vers lesquels le N est distribué prioritairement avec une chute très significative de la teneur en N dans les feuilles (Malagoli *et al.*, 2005a ; **Figure B-5**).

Au final, le développement d'une silique jusqu'à maturité de la graine peut atteindre 6-7 semaines et la croissance des graines ne démarre que 20 jours après le début du développement des siliques, lorsque ces dernières passent d'un état hétérotrophe pour le carbone à un état autotrophe. La graine croît alors selon une cinétique pouvant être divisée en trois phases : (i) une phase de croissance lente suivie (ii) d'une phase de croissance rapide faisant passer les graines de 1,5 à 5 mg en trois semaines et enfin (iii) une phase finale de remplissage de la graine qui passe d'une masse moyenne de 5 à 5,8 mg sur une durée moyenne de 15 jours. Enfin, à maturité, les graines sont récoltées dès que leur taux d'humidité est inférieur à 15%. A ce stade, l'observation doit être précise et la récolte qui en découle rapide car la déhiscence des siliques conduisant à la dispersion des graines peuvent être provoquées par le moindre choc (Leterme, 1985).

B.II Vers l'amélioration de l'Effizienz d'Usage de l'Azote (EUA) chez le colza

B.II.1 Définitions et composantes de l'EUA

La première définition de l'EUA (**Figure A-4**) a été proposée par Moll *et al.* (1982) et correspond au rendement en grains produit par unité de N disponible. L'EUA résulte des capacités de la plante à absorber le N provenant du sol (Effizienz d'Absorption de l'Azote, EAbA) et à utiliser le N absorbé pour produire des graines (Effizienz d'Utilisation de l'Azote, EUtA). Depuis quelques années, plusieurs études ont permis d'établir que l'EUtA correspond à la résultante des capacités d'assimilation du N (Effizienz d'Assimilation de l'Azote, EAA) et à le

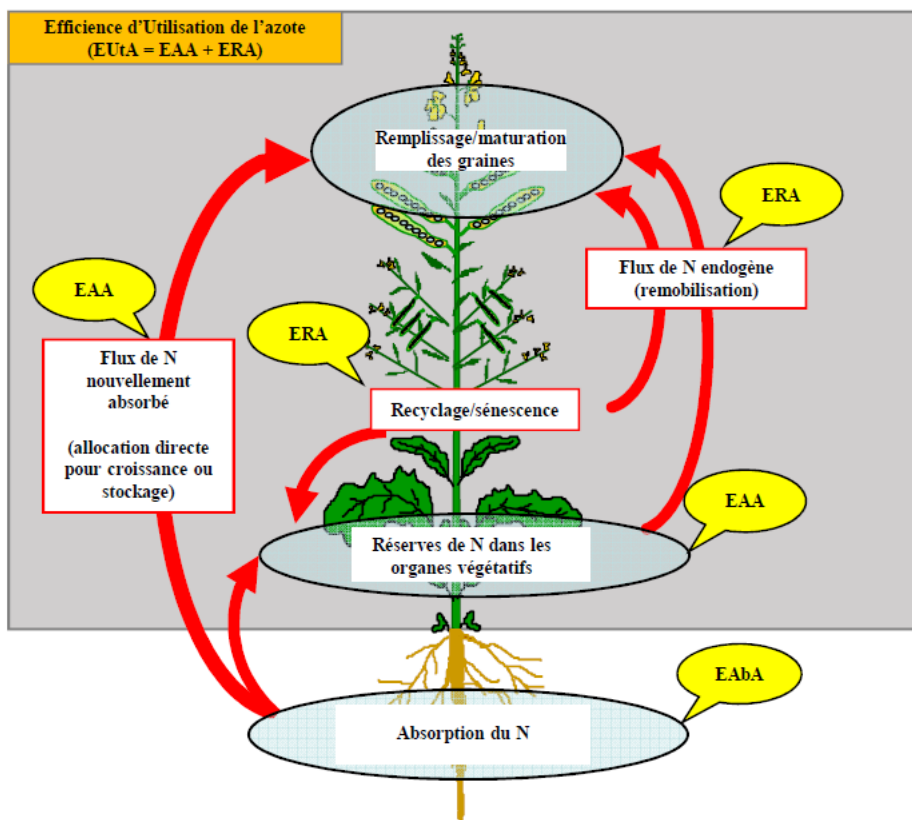


Figure B-6 : Présentation des composantes de l'efficacit e d'usage de l'azote (EUA) chez le colza. EAbA : Efficacit e d'Absorption de l'Azote ; EAA : Efficacit e d'Assimilation de l'Azote ; ERA : Efficacit e de Remobilisation de l'Azote ; EUtA : Efficacit e d'Utilisation de l'Azote (D'après Avic e et Etienne, 2014).

remobiliser vers les parties en croissance (Efficience de Remobilisation de l'Azote, ERA) (**Figure B-6**, Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010 ; Avice et Etienne, 2014 ; Girondé, 2015).

La définition et les méthodes de calcul de l'EUA peuvent être différentes en fonction des cultures et des stades de développement considérés (Good *et al.*, 2004 ; Rathke *et al.*, 2006 ; Han *et al.*, 2015 ; Bouchet *et al.*, 2016). En effet, à la récolte, l'EUA est souvent estimée par le rendement en grain par unité de N apporté à la culture par fertilisation (Good *et al.*, 2004 ; Rathke *et al.*, 2006). Au stade végétatif, la définition de l'EUA correspond au rapport entre la biomasse aérienne totale produite et l'apport en N ou encore le ratio entre la biomasse aérienne produite en conditions de limitation en N et celle produite en conditions non limitantes (Balint et Rengel, 2008).

Le colza est considéré comme une espèce présentant une faible EUA réalisant un faible rendement grainier par unité d'azote apportée (Avice et Etienne, 2014 ; Bouchet *et al.*, 2016). Dans le but d'améliorer l'EUA, il est nécessaire de rechercher la/les composantes responsables de la faible EUA chez le colza et d'identifier les pratiques et les traits à optimiser. Les différentes voies d'amélioration de l'EUA reposant sur des itinéraires techniques innovants ou sur l'optimisation de certaines composantes de l'EUA qui ont été explorées ces dernières années sont rappelées dans les chapitres suivants.

B.II.2 Amélioration de l'EUA via une optimisation des pratiques culturales

Dans les années 1980, l'agriculture intensive a favorisé l'apport très élevé de fertilisants azotés pour la culture de colza atteignant en moyenne 250 kg/ha. Le CETIOM, aujourd'hui Terres Inovia, introduit dès 1994 la notion de « calcul des doses optimales d'azote à apporter » en tenant compte du N contenu dans les plantes en sortie d'hiver. Cet ajustement des apports en N traduit ainsi, dès les années 1990, la volonté de diminuer ces intrants azotés coûteux et polluants pour l'environnement répondant ainsi aux directives nitrate comme celle de 1991 (91/676/CEE).

Depuis ces années 1990, la gestion du N a été sensiblement améliorée grâce à l'apparition de divers outils de mesure du statut azoté des plantes mais aussi grâce à l'apparition de nouveaux modes de fertilisation et de pratiques culturales émergentes. En effet, l'apport de fertilisants azotés a diminué de 10% entre 1996 et 2005 (www.terresinovia.fr).

B.II.2.a Mesurer l'état nutritionnel de la plante afin d'optimiser les apports en N

Des méthodes de diagnostic du statut azoté ainsi que des outils d'aide à la décision ont été mis en place ces dernières années afin de permettre aux agriculteurs d'ajuster l'apport azoté en



Figure B-7: Illustration des étapes proposées par la réglette azote colza® mise au point par Terres Inovia. (D'après www.regletteazotecolza.fr).

fonction de leurs objectifs de rendement tout en limitant les pollutions provoquées par une fertilisation excessive. Ces méthodes destructives ou non destructives sont décrites ci-dessous.

- Le calcul de l'**indice de nutrition azotée** (INN) est une méthode destructive utilisée pour définir si la nutrition azotée est suffisante pour atteindre des objectifs de rendement définis. Cet indice est calculé à partir de la teneur critique en N (TCN) qui correspond à la teneur minimale en N permettant d'atteindre une croissance maximale. Chez le colza, elle est définie d'après la formule suivante (Colnenne *et al.*, 1998) :

$$TCN \text{ (en \% de la MS en t/ha)} = 4,48 * MS^{-0,25}$$

avec 4,48 correspondant à la teneur optimale en N (%) pour une biomasse cumulée de 1 t/ha et 0,25 correspondant au coefficient de dilution de N accumulé au cours de la croissance. L'INN est calculé comme le rapport entre la TCN et la teneur en N mesurée dans les parties aériennes (Lemaire *et al.*, 1989). Si l'INN est proche de 1 alors sa valeur approche celle de la TCN et correspond alors à une teneur minimale suffisante pour atteindre un rendement maximal.

- La **Réglette azote colza®**, mise au point par Terres Inovia dès 1994, permet d'optimiser les apports azotés en fonction du site géographique, du type de sol (superficiel ou profond), de l'amendement organique de la parcelle, des objectifs de rendements, du poids des colzas à l'automne et en sortie d'hiver (destruction de 2-4 m² par pesée), des cultures précédentes et du couvert associé (**Figure B-7**). Pour les agriculteurs, c'est un outil d'aide à la décision disponible directement sur internet (www.regletteazotecolza.fr) mis à jour régulièrement avec la prise en compte de nouvelles variables.
- A partir de la réglette azote colza®, YARA en collaboration avec Terres Inovia ont mis au point récemment une application smartphone (**YARA Image IT**) qui permet à partir de simples photographies d'estimer la quantité de N absorbé dans les parties aériennes du colza à l'entrée et à la sortie de l'hiver. Cette estimation est basée sur l'analyse d'image des pigments verts des photographies et ne nécessite aucune destruction de matériel végétal. Cette méthode est utilisable pour un taux de couverture du colza allant jusqu'à 80% mais ne convient pas à des colzas ayant dépassé 1 kg/m².
- Certains appareils tels que la **pince SPAD** (SPAD-502 model, Minolta) ou le **N-Tester** (YARA) (**Figures B-8A et 8B**) permettent des mesures de transmittance de certaines radiations lumineuses (650 et 940 nm). Cet indice de transmittance est corrélé au niveau de chlorophylles qui est fortement associé à un niveau de N foliaire (Jusko *et Kosciak*, 2002). Par ailleurs, cette mesure reste localisée sur une partie du limbe et ne peut refléter l'ensemble du couvert végétal.
- D'autres appareils piétons (**Greenseeker** et le **Yara N-sensor** ; **Figures B-8C et 8D**) ou embarqués sur quad, tracteur ou drone, permettent de calculer un indice de végétation

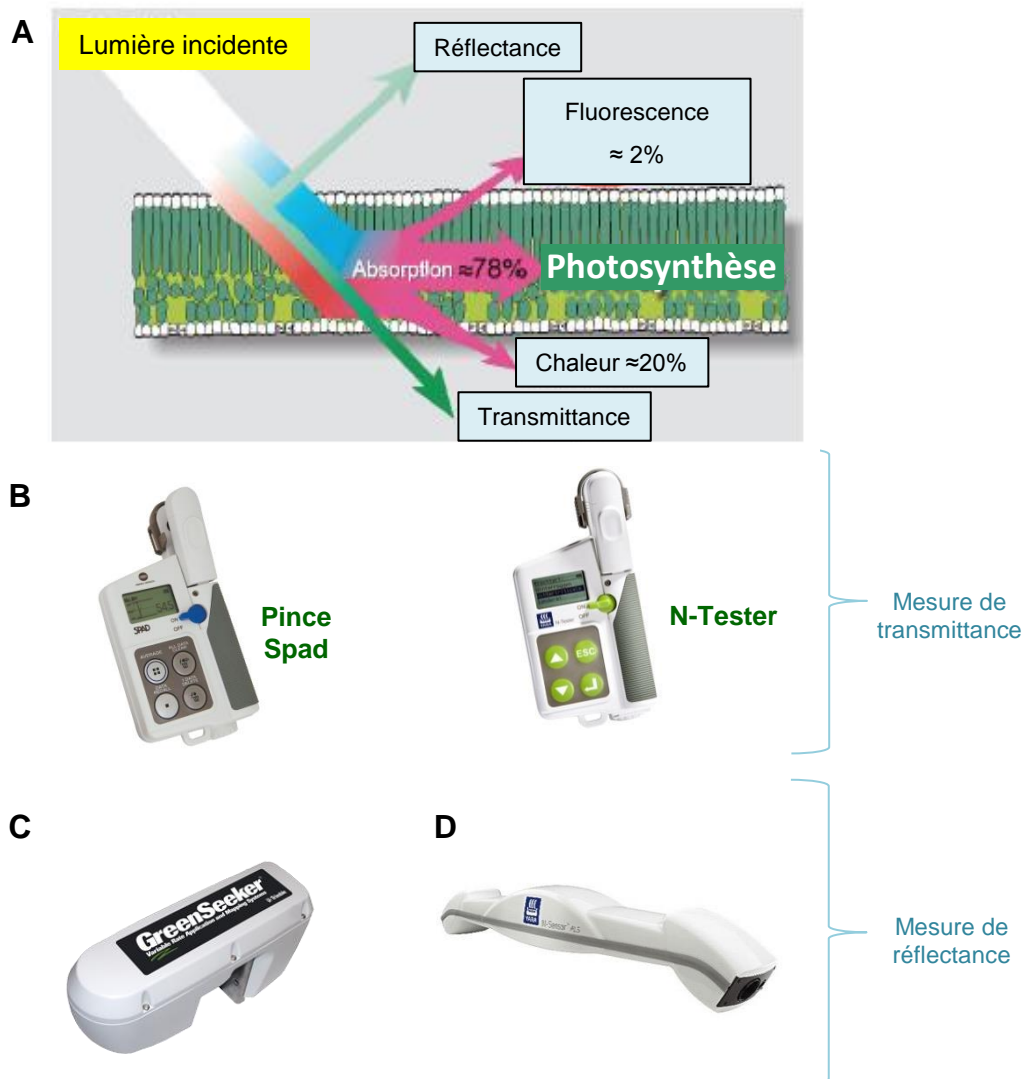


Figure B-8: (A) Rappels des phénomènes de réflectance, absorption, transmittance et fluorescence de la lumière incidente au niveau d'un limbe foliaire, (B) Pince SPAD (SPAD-502 model, Minolta) et N-Tester (Yara) permettant des mesures de transmittance, (C) Greenseeker et (D) Yara N-sensor permettant des mesures de réflectance afin d'estimer le statut azoté des de plantes ou de parcelles.

(NDVI : « Normalized Difference Vegetation Index »), basé sur des mesures de réflectance (Bell *et al.*, 2004). La réflectance correspond au rapport entre le flux lumineux émit par l'appareil et celui réfléchi par le couvert végétal, et permet d'estimer les teneurs en chlorophylles, le statut N ainsi que la biomasse de la parcelle. Cependant, si le couvert végétal de la parcelle est hétérogène ou si les conditions météorologiques sont changeantes, la mesure de réflectance perd en fiabilité.

En parallèle, des systèmes de télédétection par satellite comme **FarmStar Expert** (développés par EADS-ASTRIUM et ARVALIS en collaboration avec Terres Inovia) sont basés sur des mesures de réflectance par satellite. Ces techniques ont l'avantage de discriminer au sein d'une parcelle donnée des zones présentant des statuts azotés différents. Bien que très précises, ces techniques sont très dépendantes des conditions climatiques comme le couvert nuageux et restent très onéreuses.

- Enfin certains appareils tels que le **DUALEX®** et le **MULTIPLEX®** (Force-A) permettent de mesurer le statut azoté (NBI : « Nitrogen Balance Index ») d'une parcelle par des mesures de fluorescence. Le principe de fonctionnement du Multiplex sera décrit dans le chapitre C (**Figure C-6**). Ces mesures de fluorescence sont en cours de développement dans le cadre du programme Rapsodyn et seraient plus fiables que des mesures de réflectance car moins sensibles aux changements météorologiques.

B.II.2.b Optimiser les itinéraires techniques

Parallèlement à ces nouvelles techniques de mesure du statut azoté permettant d'optimiser la fertilisation azotée des parcelles, d'autres pratiques culturales ainsi que les systèmes de culture se sont améliorés ces dernières années.

En effet, aujourd'hui la forme azotée à apporter est discutée. Les trois formes principales d'apports azotés correspondent à l'ammonium, au nitrate et à l'urée. L'ammonium est un ion chargé positivement qui se fixe aux colloïdes du sol diminuant ainsi sa disponibilité pour la plante tandis que le nitrate (ion chargé négativement) ne se fixe pas aux colloïdes du sol mais est plus sujet aux phénomènes de lessivage. Il a été démontré que lors de culture de colza en hydroponie, un apport de N composé de 25% de nitrate et 75% d'ammonium permet d'augmenter la croissance dans les premiers stades de développement comparé à une alimentation uniquement composée de nitrate (Rathke *et al.*, 2006). Par ailleurs, Arkoun *et al.* (2012) ont démontré *via* des techniques d'apports de ¹⁵N lors de culture de colza en lysimètres, que le N apporté sous forme de nitrate d'ammonium était très bien absorbé par la plante mais que les pertes pouvaient atteindre jusqu'à 23% du N apporté. En parallèle, un apport azoté sous forme d'urée combiné à un inhibiteur d'uréase (NBPT) permettait une absorption efficace du N avec une perte de seulement 8% du N apporté.

L'utilisation de biostimulants, possédant une teneur faible en N, phosphore et potassium, est également une piste prometteuse. En effet, chez le colza, l'application d'un extrait d'algue nommé AZAL 5 (TIMAC AGRO, groupe ROULLIER) au stade végétatif permet une meilleure absorption du N grâce à l'induction des transporteurs racinaires de nitrate (Jannin *et al.*, 2013 ; Billard *et al.*, 2013). Les interactions avec les autres intrants notamment les fertilisants soufrés sont également à davantage prendre en compte car une optimisation des apports en sulfate par rapport au niveau de fertilisation N peut constituer un levier très efficace d'amélioration de l'EUA chez le colza (Schnug *et al.*, 1993, Fismes *et al.*, 2000, Dubousset *et al.*, 2010).

Au niveau des systèmes de culture, la combinaison en rotation ou en association du colza avec une légumineuse est une voie d'amélioration de l'EUA très prometteuse. En effet, les légumineuses sont capables d'assurer leur propre alimentation azotée (fixation symbiotique du N₂) et permettent également d'enrichir le milieu d'une partie de cet azote (engrais verts). Il a été démontré qu'une rotation pois-colza permet d'augmenter le rendement du colza lors de faibles apports azotés (de 0 à 30 kg/ha) par rapport à une rotation orge-colza (Hebinger, 2013). Par ailleurs lors de cette même étude, le rendement d'un colza de pois fertilisé avec seulement 70 kg de N/ha n'est pas significativement différent des rendements obtenus avec un apport de 120 ou 180 kg/ha chez des colzas de pois ou des colzas d'orge. Par ailleurs, le colza en association avec une plante fixatrice, telle que le trèfle ou la féverole, pourrait permettre de réduire les apports de 30 kg de N/ha sans risques de perte de rendement pour le colza.

En résumé, grâce à de nouveaux outils d'estimation du statut N et à la mise en place de nouveaux itinéraires techniques, la fertilisation azotée et *in fine* l'EUA du colza ont été significativement améliorées ces dernières années. Néanmoins, dans un contexte de limitation des intrants azotés, le maintien voire l'accroissement des rendements du colza requiert, en parallèle de l'optimisation des itinéraires techniques, une amélioration des performances agronomiques de cette oléoprotéagineuse. Depuis une dizaine d'années, les recherches se sont donc focalisées sur les différentes composantes de l'EUA afin d'identifier les déterminants physiologiques et moléculaires à l'origine d'une meilleure EUA chez le colza.

B.II.3 Amélioration de l'EUA via une optimisation de la composante EAbA : l'Efficiencia d'Absorption de l'Azote

Le nitrate correspond à la principale forme de N absorbé par le colza et les capacités d'absorption du N varient lors du développement du colza comme décrit dans la partie B.I. L'absorption du nitrate est dépendante de transporteurs racinaires de faible affinité constitutifs (CLATS) et inductibles (ILATS) et de haute affinité constitutifs (CHATS) et inductibles (IHATS) (Malagoli *et al.*, 2004 ; Tsay *et al.*, 2007 ; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010 ; Krapp *et al.*, 2014).

Durant les **stades végétatifs**, le colza présente une capacité d'absorption parmi les plus élevées en comparaison à d'autres espèces de Brassicacées (Laîné *et al.*, 1993). C'est pourquoi le colza est qualifié de « pompe à nitrate » et peut être utilisé comme CIPAN. Une étude a par ailleurs démontré que les variations d'EUA chez 4 génotypes de colza de printemps n'étaient pas liées à des variations d'absorption du N mais à des fluctuations de l'utilisation du N à ces stades (Svecnjak et Rengel, 2006).

Au contraire, lors des **stades reproducteurs**, l'absorption du N diminue considérablement chez le colza en conditions de plein champ (Noquet *et al.*, 2004 ; Malagoli *et al.*, 2005b) mais également sous conditions contrôlées (Rossato *et al.*, 2001, Malagoli *et al.*, 2004). Cette diminution d'absorption est donc liée à la fois à des facteurs environnementaux tels qu'une faible disponibilité en N à cette période souvent associée à des épisodes de sécheresse (Merrien *et al.*, 1988) mais également à des facteurs endogènes conduisant à la répression de l'expression des transporteurs de nitrate au niveau racinaire (Malagoli *et al.*, 2004). Le colza est donc caractérisé par une faible EAbA aux stades reproducteurs qui rend ainsi l'absorption du N limitante pour le rendement.

En effet, de nombreuses études démontrent une corrélation positive entre l'absorption du N post-anthèse chez le colza et le rendement grainier (EUA) (Wiesler *et al.*, 2001b ; Berry *et al.*, 2010 ; Ulas *et al.*, 2013 ; Bouchet *et al.*, 2016). Une étude de 10 génotypes de colza d'hiver cultivés en plein champs démontre que le rendement grainier augmente de 0,16 quintaux/ha par kg de N absorbé après floraison (Berry *et al.*, 2010). De plus, une étude en conditions de plein champ suppose que, chez deux génotypes de colza d'hiver (cv. Capitot et Apex), une meilleure absorption du N aboutirait à une meilleure capacité photosynthétique des feuilles. Ceci engendrerait une augmentation de l'apport de photoassimilats aux racines, une croissance plus importante des racines et donc une augmentation de l'absorption du N (Wiesler *et al.*, 2001b). Par ailleurs, lors de ces stades de développement, il a été démontré que sous faibles apports azotés l'EAbA correspond à une composante limitante pour le rendement du colza (Berry *et al.*, 2010 ; Schulte auf'm Erley *et al.* 2011 ; Nyikako *et al.* 2014) tandis qu'en condition de N pléthorique c'est la composante EUtA qui prend le plus d'importance (Schulte auf'm Erley *et al.* 2011).

En conclusion, l'amélioration de l'EAbA post-anthèse chez le colza correspond à une piste intéressante afin d'améliorer l'EUA particulièrement en condition de N limitant. Néanmoins, même si un apport d'intrants azotés post-floraison pourrait augmenter le rendement grainier d'un colza de printemps (Dreccer *et al.*, 2000), l'objectif n'est pas d'augmenter les apports de fertilisants N mais plutôt de les réduire afin d'améliorer le bilan agro-environnemental du colza. Dans la perspective d'améliorer l'EUA sous contrainte azotée, l'amélioration de la composante EAbA post-floraison ne sera donc pas suffisante.

Ainsi, l'amélioration de l'utilisation du N prélevé aux stades végétatifs et lors de la transition stades végétatifs / stades reproducteurs reste une piste prometteuse et permettrait au colza de maintenir ou d'améliorer le rendement grainier sans apport de N supplémentaire.

B.II.4 Amélioration de l'EUA via une optimisation de la composante EUtA : l'Efficienc e d'Utilisation de l'azote

Aux stades végétatifs, l'EUtA est généralement estimée comme la biomasse aérienne produite par quantité de N retrouvé dans les parties aérienne tandis. Aux stades reproducteurs, l'EUtA est déterminée par la masse de graines produites par quantité de N retrouvé dans les parties aériennes en fin de culture. Ces méthodes de calculs permettent d'estimer l'EUtA mais rendent difficile la distinction entre ces 2 sous composantes (EAA et ERA) qui peuvent être spécifiquement ou conjointement améliorées.

B.II.4.a La sous-composante EAA : l'Efficienc e d'Assimilation de l'Azote

Le métabolisme de l'azote au sein des cellules végétales est résumé sur la **Figure B-9** (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Brièvement, le nitrate absorbé va être réduit en nitrite dans le cytosol des cellules *via* la nitrate réductase (NR). Le nitrite formé va ensuite être réduit en ammonium *via* la nitrite réductase (NiR) dans les plastes des cellules foliaires et racinaires. Par la suite l'ammonium est incorporé au glutamate pour former la glutamine *via* la glutamine synthétase (GS). La glutamine et un α -cétoglutarate vont produire 2 glutamates *via* l'action de la glutamine oxoglutarate aminotransférase (GOGAT). En plus de la voie d'assimilation GS/GOGAT, l'ammonium peut être incorporé directement sur l' α -cétoglutarate pour former du glutamate *via* la glutamate déshydrogénase (GDH) mais cette voie est seulement utilisée lors d'un excès d'ammonium dans la cellule (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Enfin le transfert du groupement ammonium d'un glutamate vers avec un acide α -cétonique permet la formation de divers acides aminés par le biais d'aminotransférases. La synthèse d'acides aminés permet *in fine* la synthèse de protéines.

Plusieurs études visant à augmenter les capacités d'assimilation du N ont été réalisées. La surexpression des gènes codant la NR et la NiR permet d'améliorer l'absorption de nitrate mais n'a aucun impact sur la production de biomasse ou sur le rendement chez différentes espèces telles que le tabac ou *A. thaliana* (Good *et al.*, 2004).

Par ailleurs, chez le tabac, une surexpression du gène codant pour la GS permet d'augmenter la croissance de plantes cultivées sous contraintes azotées (Fuentes *et al.*, 2001). De plus, des approches transgéniques ont permis d'améliorer l'EAA grâce à la surexpression d'une l'alanine aminotranférase d'orge ou encore d'une asparagine synthétase (permettant le transfert d'un groupement amide de la glutamine sur un aspartate pour produire de l'asparagine) issu

d'*Escherichia coli* chez des plantes de colza (Good et Beatty, 2011). Cette amélioration de l'assimilation du N a permis d'augmenter la biomasse et d'améliorer le rendement du colza sous faibles apports azotés lors de la surexpression de l'alanine aminotransférase (Good *et al.*, 2007) et d'améliorer le rendement en condition de fort apport azoté dans le cas d'une surexpression de l'asparagine synthétase (Good et Beatty, 2011).

En conclusion, il est possible d'améliorer l'EUA grâce à une optimisation de l'EAA par le biais d'obtentions de plantes génétiquement modifiées surexprimant certaines enzymes impliquées dans l'assimilation du N. Néanmoins, bien que la création et la culture de plantes génétiquement modifiées soient utiles en laboratoire de recherche, ces plantes restent interdites à la commercialisation et à la culture au champ en France. Il est donc nécessaire d'appréhender d'autres pistes permettant l'amélioration de l'EAA via notamment l'exploration de la variabilité génotypique.

B.II.4.b La sous-composante ERA : l'Efficiencia de Remobilisation de l'Azote

Dans un contexte de limitation des apports azotés, l'optimisation de l'ERA est probablement un des meilleurs leviers pour améliorer significativement l'EUA chez le colza (Avicé et Etienne, 2014). Une étude récente a d'ailleurs démontré que la meilleure EUA d'hybrides de colza en comparaison à certaines lignées serait associée, entre autres, à une remobilisation plus efficace du N des parties végétatives vers les organes reproducteurs (Koeslin-Findeklee *et al.*, 2014).

L'amélioration de la remobilisation permettrait un meilleur recyclage des ressources azotées à partir des tissus végétatifs limitant ainsi la perte de N dans les organes sénescents susceptibles de chuter au sol. Ceci mènerait nécessairement à une réduction des intrants azotés et ainsi à une amélioration du bilan agroenvironnemental des plantes de grandes cultures comme le colza (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010 ; Gregersen *et al.*, 2013 ; Avicé et Etienne, 2014).

La remobilisation du N est fortement associée aux phénomènes de sénescence qui permettent la redistribution des nutriments des organes « sources » vers les organes en croissance ou les organes de stockage qualifiés d'organes « puits » (Peoples et Dalling, 1988). En effet, chez le colza, lorsque l'offre est supérieure à la demande, l'azote va être stocké majoritairement au sein des feuilles sous forme de protéines, de peptides et d'acides aminés. La protéolyse constitue par ailleurs l'un des plus importants processus de remobilisation du N au niveau foliaire (Hörtensteiner et Feller, 2002). Lors de la remobilisation du N, les protéines sont dégradées, par des protéases, en peptides et acides aminés qui seront exportés, grâce à des transporteurs, des organes sources vers les organes puits *via* les tissus conducteurs du phloème.

Les acides aminés sont principalement transportés sous la forme de glutamine, glutamate et asparagine (Lohaus et Moellers, 2000 ; Lohaus et Schwerdtfeger, 2014). C'est pourquoi, les enzymes d'assimilation du N, telles que la GS cytosolique (GS1), la GDH et l'asparagine synthétase (AS) déjà présentées précédemment, jouent un rôle important lors de la

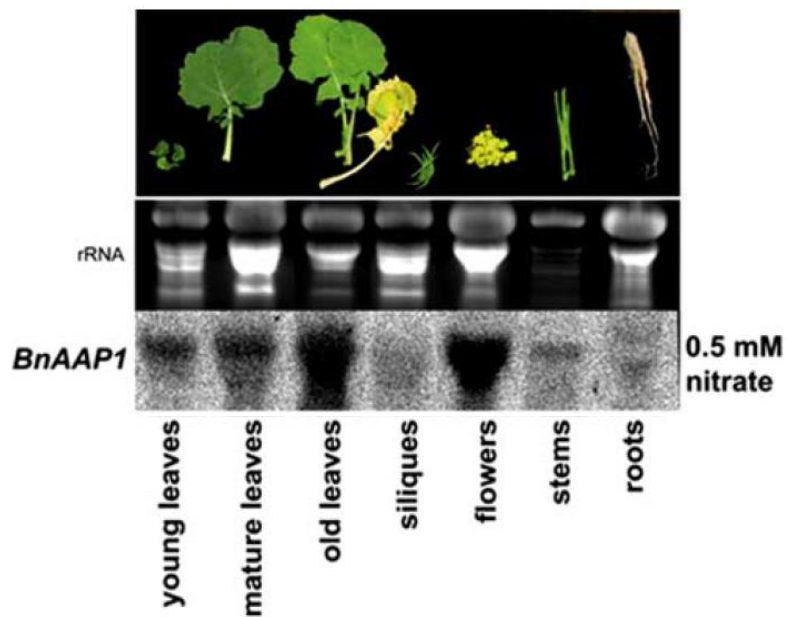


Figure B-10 : Expression de *BnAAP1* (gène codant un transporteur d'acides aminés) chez le colza d'hiver (cv. Lirajet). (D'après Tilsner *et al.*, 2005).

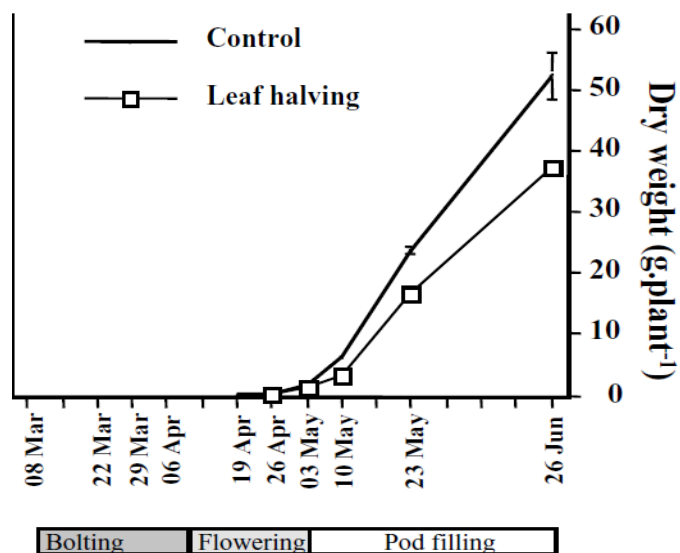


Figure B-11 : Effet de la suppression de 50% des feuilles en début de montaison sur la biomasse des siliques en fin de culture. (D'après Noquet *et al.*, 2004).

remobilisation du N pendant la sénescence (**Figure B-9B**). Par ailleurs, l'activité de ces enzymes ne semble pas limiter la remobilisation du N chez le colza ou chez d'autres espèces comme *Arabidopsis thaliana*. En effet, les familles de gènes *BnaGLN1.1* et *BnaGLN1.4* correspondant à diverses isoformes de GS chez le colza sont surexprimées pendant la sénescence foliaire et en réponse à une limitation en N (Orsel *et al.*, 2014). De plus, la quantité et l'activité GDH augmentent lors de la sénescence foliaire chez *A. thaliana* (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010 ; Girondé *et al.*, 2015b). Enfin, des mutants d'*A. thaliana* n'exprimant pas *ASN2* (codant une asparagine synthétase) présentent un défaut de remobilisation du N associé à un retard de sénescence (Gaufichon *et al.*, 2013).

Enfin, les produits de protéolyse (acides aminés et oligopeptides) sont exportés de la cellule source vers les tissus conducteurs par des systèmes de transports dédiés. Des études démontrent que le transport de ces acides aminés ne semble pas limiter la remobilisation du N chez le colza. En effet, chez deux génotypes de colza (cv. Lirajet, Tilsner *et al.*, 2005 ; cv. Capitot, Desclos, 2008) une induction du gène du transporteur AAP1 (amino acid permease 1) a été observé chez des feuilles âgées en cours de la sénescence foliaire (**Figure B-10**) et aucune accumulation d'acides aminés n'a été observée dans les feuilles (Tilsner *et al.*, 2005). Ainsi, la synthèse d'acides aminés transportables et le transport des acides aminés ne semblent pas être limitants pour la remobilisation du N lors de la sénescence. C'est pourquoi les recherches actuelles se focalisent sur la compréhension des mécanismes de protéolyse qui semblent aujourd'hui être le principal facteur limitant de la remobilisation du N chez le colza (Avice et Etienne, 2014 ; Girondé *et al.*, 2015a). Les mécanismes de protéolyse associés à la sénescence seront particulièrement présentés dans la partie B.IV.

Au cours des **stades végétatifs**, les feuilles subissent la sénescence dite séquentielle présentée précédemment dans la **Figure B-2**. L'analyse de la gestion du N lors des stades végétatifs de la culture de colza présentée dans les paragraphes B.I.2 et B.I.3 a clairement mis en évidence l'importance (i) du stockage azoté dans les feuilles, (ii) de la remobilisation de ces réserves lors de la reprise de végétation et (iii) des pertes azotées provoquées par la chute des feuilles. L'amélioration de la remobilisation du N à ces stades semble donc cruciale afin d'optimiser l'EUA et le bilan agro-environnemental du colza. En effet, en début de montaison, l'ablation de 50% des feuilles, soit une perte importante du N endogène, provoque une chute de 30% de la biomasse des siliques (**Figure B-11**, Noquet *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'ERA à ces stades est qualifiée d'inefficace car les feuilles sénescentes chutent avec une proportion de N pouvant atteindre jusqu'à 3% de la MS (Malagoli *et al.*, 2005b) soit plus de la moitié du N stocké dans les feuilles à cette période (Hebinger, 2013). Des études de modélisation ont d'ailleurs

permis d'estimer qu'une perte de N de seulement 1% au lieu de 2% de la MS des feuilles améliorerait le rendement final du colza de 10% (Malagoli *et al.*, 2005a).

Une étude récente a consisté à caractériser l'EUA, l'ERA et la sénescence de 10 génotypes de colza d'hiver au stade rosette cultivés en serre en présence ou absence d'une limitation azotée (Girondé *et al.*, 2015a). Cette étude a permis de mettre en évidence une variabilité génotypique de l'ERA au stade rosette et de classer les génotypes en fonction de leurs capacités de remobilisation du N en conditions fort ou faible azote. Cette étude a également permis de clairement mettre en relation la capacité à remobiliser l'N de façon efficace avec la capacité des génotypes à dégrader efficacement les protéines solubles des feuilles (Girondé *et al.*, 2015a). Ainsi la compréhension des mécanismes de protéolyse associés à une remobilisation efficace du N pendant la sénescence séquentielle, particulièrement lors d'une limitation en N, est un prérequis essentiel à l'amélioration de l'EUA par le biais d'une optimisation de l'ERA chez le colza (Avice et Etienne, 2014 ; Girondé *et al.*, 2015a).

Les **stades reproducteurs** les plus tardifs sont caractérisés par la sénescence dite monocarpique comme présenté sur la **Figure B-2**. Cette sénescence affecte l'ensemble des parties végétatives dans le but de remobiliser le N vers les graines et aboutit à la mort du végétal.

Durant cette période, les feuilles restent les principales sources de N (Rossato *et al.*, 2001 ; Gombert *et al.*, 2010). Même si elle est soumise à de la variabilité génotypique, la remobilisation du N lors de ces stades est particulièrement efficace (Malagoli *et al.*, 2005b ; Ulas *et al.*, 2013 ; Girondé *et al.*, 2015b). En effet, les feuilles chutent avec une teneur en N résiduel avoisinant seulement 1% de la MS contre 3% aux stades végétatifs (Malagoli *et al.*, 2005b). De plus, il a été démontré que plus de 80% du N présent dans les feuilles au début de floraison était remobilisé (Ulas *et al.*, 2013). Une étude récente chez deux génotypes de colza aux stades reproducteurs a démontré que le génotype (cv. Aviso) présentant une meilleure remobilisation du N des feuilles et des tiges présentait également une teneur en N des graines plus importante (Girondé *et al.*, 2015b). De plus, ces travaux ont également révélé que cette plus forte remobilisation du N était fortement associée à une meilleure dégradation des protéines insolubles et des oligopeptides et une meilleure exportation des composés N.

Même si les feuilles contiennent le pool de N le plus important, les tiges et les péricarpes semblent également importants (Girondé *et al.*, 2015b). En effet, le N provenant des tiges et remarquablement bien remobilisé (Wiesler *et al.*, 2001b, Girondé *et al.*, 2015b). De façon intéressante, une étude a démontré que la plus forte EUA de certains génotypes de printemps était associée à leur capacité à remobiliser plus efficacement le N des feuilles, des tiges et des péricarpes (Balint et Rengel, 2011).

L'ensemble des travaux portant sur l'ERA démontrent qu'un recyclage efficace des composés N lors des processus de sénescence peut conduire à améliorer l'EUA du colza. Ils soulignent également qu'une meilleure connaissance des mécanismes de protéolyse associés à la sénescence pourrait permettre d'identifier les déterminants physiologiques et moléculaires impliqués dans une forte ERA et potentiellement dans l'amélioration de l'EUA. Les chapitres suivants s'attacheront donc à décrire l'état des connaissances sur la sénescence, les systèmes protéolytiques ainsi que leur régulation.

B.III. La sénescence et la remobilisation des composés azotés

B.III.1 La sénescence : Définition et importance pour le rendement

Le terme sénescence provient du verbe latin « senescere » qui signifie « vieillir ». Comme décrit précédemment, le colza est sujet à trois types de sénescence en fonction du stade de développement (**Figure B-2**): (i) la sénescence des cotylédons (stade A), (ii) la sénescence séquentielle durant les stades végétatifs et la transition stades végétatifs / stades reproducteurs (stades B, C, D, E et F) et (iii) la sénescence monocarpique en fin de cycle (stades G).

La sénescence est un processus génétiquement contrôlé provoquant de nombreuses modifications physiologiques, biochimiques et moléculaires au sein des cellules de l'organe considéré conduisant à la mort de tout ou partie du végétal. Ce processus est essentiel à la plante car il permet de recycler les nutriments stockés dans les organes végétatifs, par des processus contrôlés de dégradation des macromolécules, vers les tissus en croissance, les organes de stockage ou les organes reproducteurs pour la formation et le remplissage des graines (Gregersen, 2011). De ce fait, la sénescence n'est pas seulement un processus dégénératif de l'organe mais un processus essentiel pour la survie du reste de la plante ou pour la pérennité de l'espèce *via* la formation des graines (Diaz-Mendoza *et al.*, 2016).

La relation entre la sénescence et le rendement des plantes cultivées a été postulée depuis plusieurs années (Thomas et Stoddart, 1980) et cette relation est particulièrement étudiée aujourd'hui (Wu *et al.*, 2012 ; Gregersen *et al.*, 2013). En effet, le rendement des plantes de grande culture s'achève par la formation et le remplissage des graines qui dépend essentiellement de deux sources de nutriments carbonés et azotés : les photoassimilats formés et transportés à partir des feuilles photosynthétiquement actives et ceux remobilisés à partir des tissus végétatifs (Yang et Zhang, 2006).

La sénescence semble aussi bien affecter le rendement de façon positive et négative. En effet, une sénescence trop précoce provoquée par divers facteurs environnementaux se traduit par

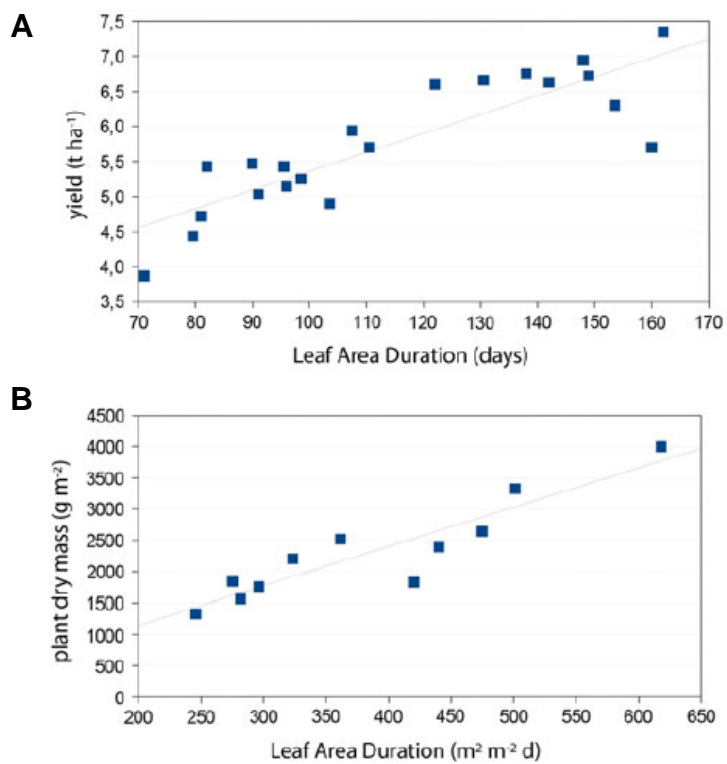


Figure B-12 : Corrélations entre la durée de la photosynthèse et le rendement chez deux espèces de grande culture, le maïs (A) et le colza (B). Les relations ont été établies à partir de 10 génotypes de maïs (A) par [Thomas et Smart \(1993\)](#) et à partir de 11 génotypes de colza ([Hunkova et al., 2011](#)). ([Gregersen et al., 2013](#)).

une baisse de la photosynthèse des tissus, une mort cellulaire précoce et limite ainsi la fourniture de nutriments aux organes en croissance chez le blé et l'orge (Gregersen *et al.*, 2008, Lobell *et al.*, 2012).

Au contraire, un retard de sénescence permet d'augmenter la période de photosynthèse et ainsi la production de photoassimilats permettant d'augmenter le rendement en grain (Richards, 2000 ; Long *et al.*, 2006). De nombreuses relations ont été établies entre la période photosynthétique et le rendement en grains (**Figure B-12** ; d'après Gregersen *et al.*, 2013). En effet, une corrélation positive entre la durée photosynthétique appelée « leaf area duration » et le rendement en grain a été établie chez 10 génotypes de maïs (**Figure B-12A** ; Thomas et Smart, 1993) tandis qu'une corrélation positive entre la durée photosynthétique et la production de biomasse sèche a été mise en évidence chez 11 génotypes de colza (**Figure B-12B** ; Hunkova *et al.*, 2011).

L'étude de génotypes dit « stay-green » a permis d'accélérer la compréhension de la relation entre la régulation de la sénescence et le rendement (Kusaba *et al.*, 2013). Ces génotypes présentent une sénescence avec une perte des capacités photosynthétiques mais un défaut de dégradation des pigments chlorophylliens (Thomas et Ougham, 2014). Certains génotypes « stay-green » sont caractérisés par un retard ou un ralentissement de la progression de la sénescence (Kusaba *et al.*, 2013), lié à un retard de transition métabolique entre assimilation et remobilisation des nutriments (Thomas et Ougham, 2014), qui sont des paramètres déterminants pour l'élaboration du rendement (Thomas et Howarth, 2000 ; Himmelblau et Amasino, 2001 ; Davies *et al.*, 2011).

En effet, chez ces plantes les capacités photosynthétiques sont prolongées permettant une acquisition de C plus importante conduisant à une production de biomasse plus importante. Néanmoins, ces génotypes présentent un défaut de remobilisation des composés azotés. En effet, les protéines membranaires thylakoïdiennes, sources non négligeables de N, ne peuvent pas être dégradées car ces génotypes présentent une rétention des chlorophylles ne permettant pas la dégradation des thylakoïdes (Gregersen, 2011 ; Thomas et Ougham, 2014). De plus, un prolongement de la sénescence résulte en un faible remplissage des graines, une faible efficacité d'usage du N et une faible teneur en protéines des grains (Mi *et al.*, 2002 ; Gong *et al.*, 2005).

Ceci démontre bien le dilemme entre la capacité à produire davantage de photoassimilats carbonés en retardant la sénescence qui permettrait une amélioration du rendement mais en parallèle une perte de l'efficacité de remobilisation des nutriments, y compris les composés N, affectant la qualité des produits récoltés.

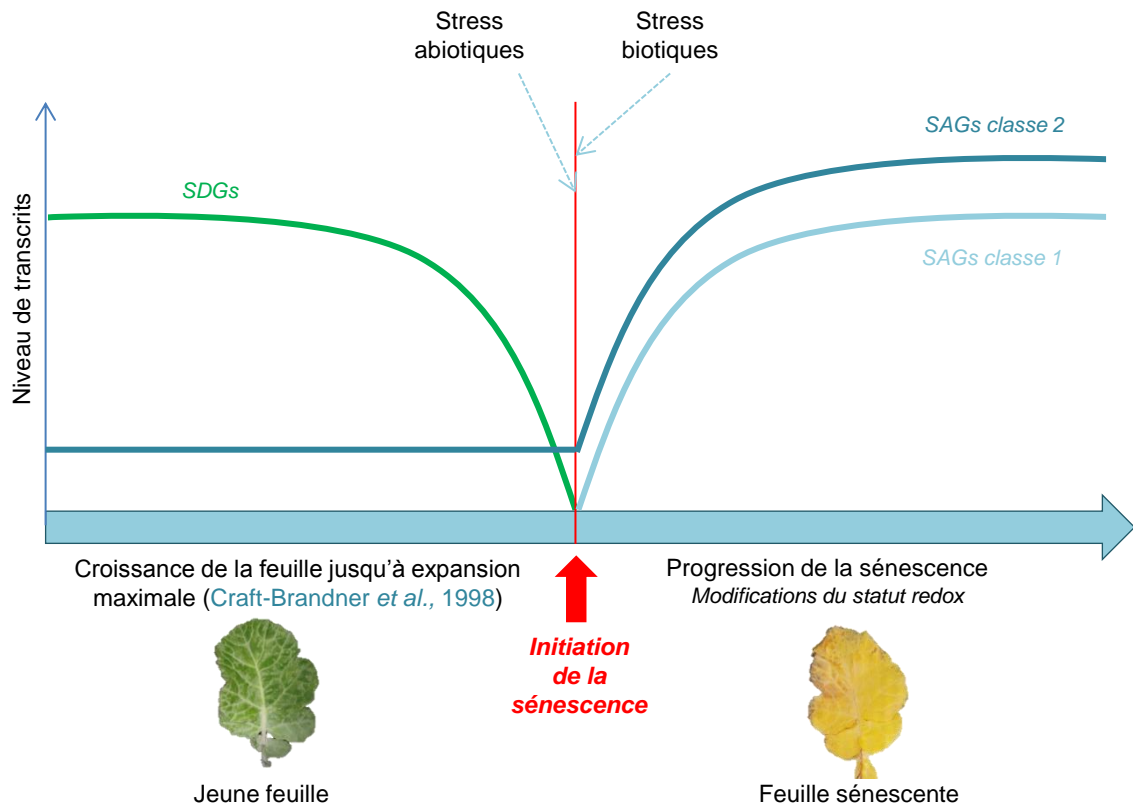


Figure B-13 : Activités transcriptionnelles associées à Paramètres associés à l'initiation et la progression de la sénescence. Le graphique représente les modifications de l'expression des SDGs "senescence down-regulated genes" et des SAGs "senescence-associated genes" lors du développement de la feuille aboutissant à l'initiation et la progression de la sénescence. (D'après Gan et Amasino, 1997 ; Zimmerman et Zentgraf, 2005).

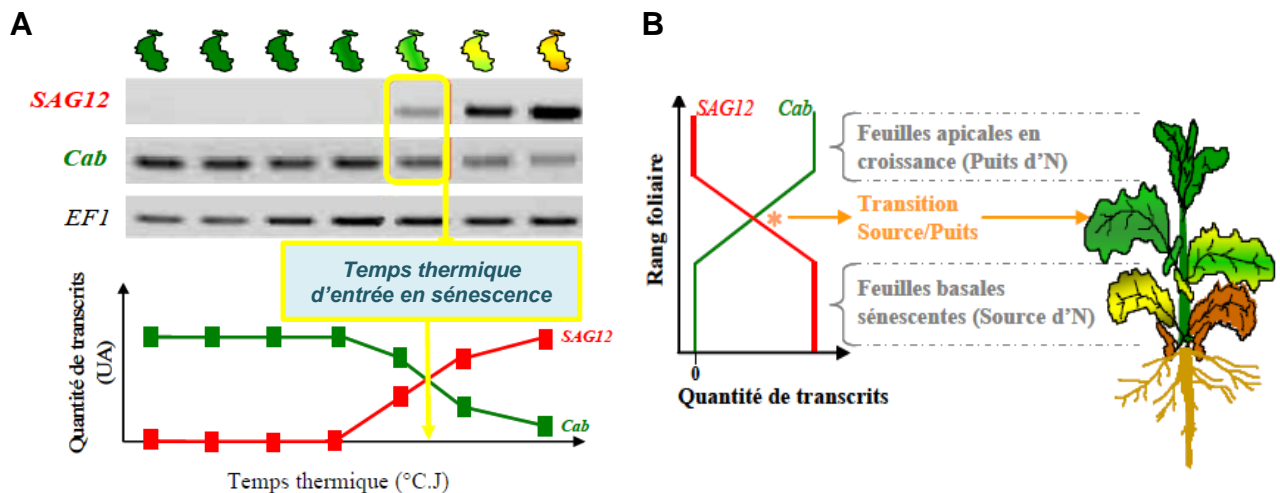


Figure B-14 : Cinétique d'expression des gènes *SAG12* et *Cab* par RT-PCR permettant de définir la date théorique d'entrée en sénescence d'une feuille de colza (A) et le dernier rang foliaire entré en sénescence à un stade de développement donné (B). Le gène *EF1- α* est utilisé comme gène de référence. (D'après Gombert *et al.*, 2006 ; figure reprise de la thèse de Marie Desclos, 2008).

B.III.2 Modifications physiologiques, biochimiques et moléculaires associées à la sénescence foliaire

La sénescence foliaire se traduit au niveau macroscopique par un jaunissement des organes associés à une dégradation des chlorophylles. Une accumulation d'autres pigments tels que des anthocyanes, des xanthophylles et des caroténoïdes est aussi observé et l'organe finit par chuter par abscission. La sénescence débute à l'extrémité des feuilles atteignant progressivement les nervures et le pétiole (Watanabe *et al.*, 2013). De profonds changements se produisent au niveau du mésophylle (Sorin *et al.*, 2014) et les tissus adjacents aux systèmes vasculaires sont les derniers à entrer en sénescence préservant les tissus conducteurs pour remobiliser les nutriments issus de la sénescence qui se manifeste dans les tissus plus externes (Gan et Amasino, 1997).

Au niveau cellulaire, la sénescence est souvent divisée en trois phases distinctes : l'initiation de la sénescence, la dégradation et la remobilisation des macromolécules et enfin la phase terminale aboutissant à la mort de la cellule.

B.III.2.a L'initiation de la sénescence

La sénescence peut être initiée par des facteurs internes ou externes. En effet, elle peut être développementale et ainsi s'initier lorsque l'organe a atteint sa maturité (Craft-Brandner *et al.*, 1998) *via* des facteurs endogènes ou modulée par divers facteurs environnementaux biotiques et abiotiques qui seront détaillés dans le chapitre §B.III.3.

La combinaison de ces différents facteurs aboutit à une modification profonde de l'expression de milliers de gènes au sein de l'organe (Guo et Gan, 2005). Par exemple, chez *A. thaliana*, il est estimé que 12-16% des gènes sont régulés pendant la sénescence (Miao et Zentgraf, 2007). Les gènes dont l'expression est réprimée pendant la sénescence sont appelés *SDGs* pour « senescence down-regulated genes » (Figure B-13). Ces gènes codent en majorité des protéines associées à la photosynthèse (Hinderhofer et Zentgraf, 2001). Par ailleurs, l'expression de nombreux gènes augmentent durant la sénescence et sont appelés *SAGs* pour « senescence-associated genes » (Hensel *et al.*, 1993 ; Lohman *et al.*, 1994, Figure B-13). Ces *SAGs* codent des protéines impliquées dans de nombreux processus tels que la dégradation des composés cellulaires, la remobilisation et le transport des nutriments et minéraux, la défense et la réponse aux stress ou encore des gènes codant des facteurs de transcription (Wu *et al.*, 2012). Certains *SAGs* (classe 2) peuvent avoir une expression constitutive mais qui augmente pendant la sénescence alors que d'autres ne sont exprimés qu'au cours de la sénescence (classe 1) (Figure B-13).

L'expression des gènes *SAGs* est également utilisée afin d'identifier l'entrée en sénescence ou comme marqueur de la progression de la sénescence. En effet, Gombert *et al.* (2006) ont utilisé

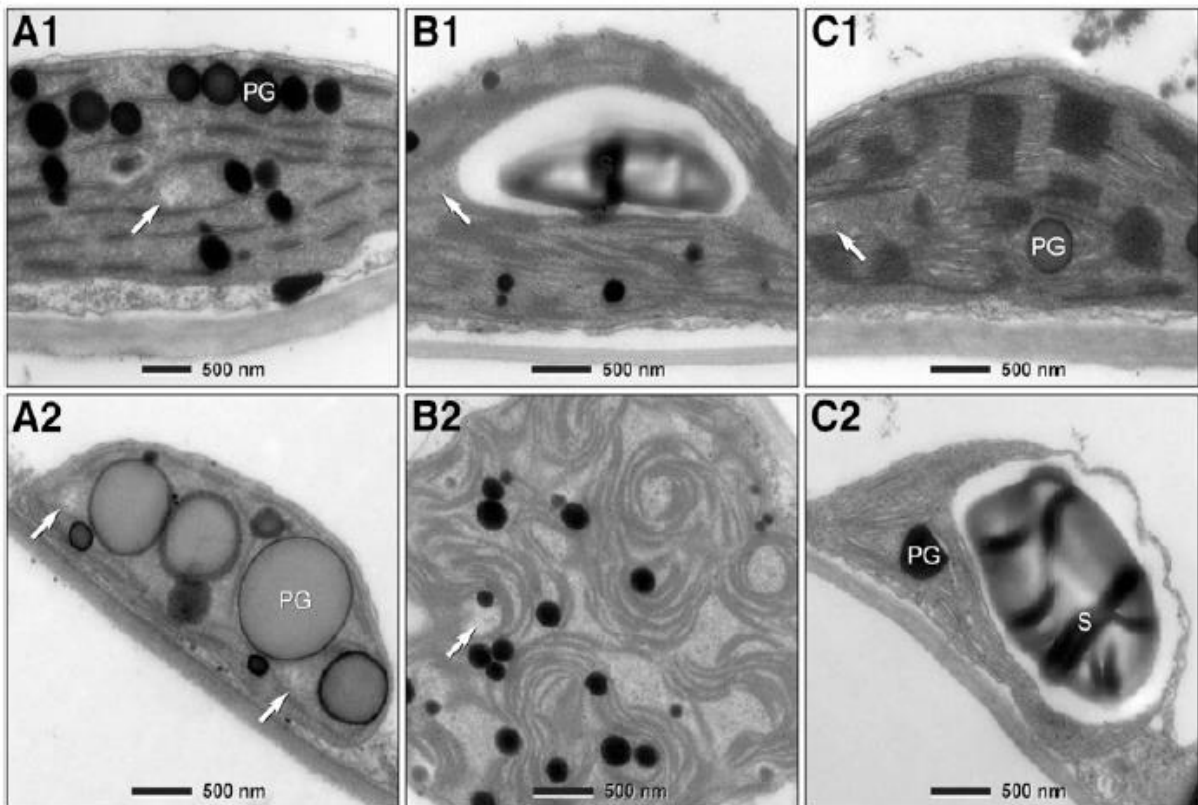


Figure B-15 : Chloroplastes et gérontoplastes observés en microscopie électronique à transmission. Les observations ont été réalisées sur des feuilles matures (1) ou sénescents (2) de betteraves sucrières (A), d'*Arabidopsis thaliana* (B) et de tabac (C). Les flèches représentent les nucléoïdes contenant de l'ADN. PG: plastoglobule. S: grain d'amidon. (D'après [Golczyk et al., 2014](#)).

l'augmentation de l'expression du gène *SAG12* (codant pour une protéase à cystéine) et la diminution de l'expression du gène *Cab* (codant une protéine de liaison aux chlorophylles a/b) afin de définir la date théorique d'entrée en sénescence d'une feuille de colza (**Figure B-14A**). A l'échelle de la plante, cette méthode permet aussi de définir le dernier rang foliaire entré en sénescence à un stade de développement donné (**Figure B-14B** ; Gombert *et al.*, 2006).

B.III.2.b La dégradation et le recyclage des éléments cellulaires

Les organites cellulaires subissent la sénescence dans un ordre précis. En effet, les premiers organites atteints correspondent aux chloroplastes et au peroxysome qui subissent des modifications structurales et fonctionnelles associées à l'augmentation de l'expression de nombreux gènes SAGs.

Le **peroxysome** va progressivement se transformer en glyoxysome activant les enzymes de la voie du glyoxylate. Cette voie va permettre *in fine* la synthèse de glucides à partir d'acétyl-coenzyme A issu de la dégradation des lipides membranaires thylakoïdiens (Lee, 2000 ; Cornah *et Smith*, 2002). Ces glucides sont essentiels aux divers mécanismes énergétiques se produisant tout au long de la sénescence (Hayashi *et al.*, 2000).

Les **chloroplastes** vont progressivement se transformer en gérontoplastes caractérisés par un nombre restreint de thylakoïdes et un grand nombre de plastoglobules (**Figure B-15**) (Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999 ; Biswal *et al.*, 2012 ; Golczyk *et al.*, 2014). Ces modifications chloroplastidiales influencent la sénescence de la cellule et de la feuille (Kusaba *et al.*, 2013).

En effet, la dégradation des composés chloroplastidiaux affecte particulièrement la photosynthèse (Gan *et Amasino*, 1997) se traduisant par une baisse de fonctionnement de la chaîne de transport d'électrons et des photosystèmes I et II (PSI et PSII) (Stressman *et al.*, 2002). De ce fait l'énergie lumineuse n'est plus utilisée pour la photosynthèse mais conduit à une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) créant un stress oxydatif. Ce stress oxydatif peut être limité par la formation d'anthocyanes et de xanthophylles possédant des propriétés physico-chimiques leur permettant de dissiper l'énergie en excès (Lu *et al.*, 2003 ; Hoch *et al.*, 2003).

Par la suite, les chlorophylles vont être dégradées par diverses enzymes (Pružinska *et al.*, 2005 ; Christ *et Hörtensteiner*, 2014) et cette dégradation aboutit également à la formation de ROS (Mittler *et al.*, 2004). Par ailleurs, cette dégradation est ralentie par l'association des chlorophylles avec des protéines nommées WSCP pour « Water Soluble Chlorophyll Binding Protein » (Horigome *et al.*, 2007 ; Damaraju *et al.*, 2011) qui leur confère une protection contre les ROS accumulés. Les chlorophylles stabilisent les protéines transmembranaires du Light

Harvesting Complex (LHC), leur dégradation permet la libération de ces protéines qui seront ensuite dégradées par des protéases (Hörtensteiner et Feller, 2002).

Lors de cette phase, les protéines chloroplastidiales, qui peuvent représenter plus de 70% des protéines foliaires (Gan et Amasino, 1997), sont également dégradées par des protéases fournissant une quantité considérable de N à remobiliser sous forme d'acides aminés et de peptides (Peoples et Dalling, 1988). Les principales protéines chloroplastidiales dégradées, les protéases associées à la sénescence, les mécanismes cellulaires permettant la mise en présence des protéases avec leur substrats et les mécanismes de régulation des activités protéasiques seront particulièrement décrits dans le chapitre §B.IV.

B.III.2.c La phase terminale

Lors de cette phase terminale, les organites jusqu'alors intacts tels que les mitochondries et le noyau vont être à leur tour démantelés (Lim *et al.*, 2007).

Les **mitochondries** sont essentielles pour la respiration et la production d'énergie (ATP) dans la cellule, il est donc cohérent que leur dégradation n'apparaisse que lors de la dernière phase de la sénescence (Quirino *et al.*, 2000 ; del Rio *et al.*, 2003). Aussi, la perte d'intégrité de l'enveloppe mitochondriale ne se produit que tardivement lors de la sénescence (Keech *et al.*, 2007).

Le **noyau** est requis pour la transcription des gènes associés à la sénescence et se maintient également tardivement lors de la sénescence (Guo et Gan, 2005 ; Lim *et al.*, 2007). Chez *Zinnia elegans*, la dégradation du noyau semble être associée à la perte d'intégrité de la vacuole (Obara *et al.*, 2001). En effet, une rupture de la vacuole provoquée *in vitro* se traduit par la dégradation rapide du noyau ainsi que des ADNs chloroplastidiaux en 10 à 20 minutes.

Enfin, les dernières étapes correspondent à la dégradation contrôlée de la **vacuole**, la condensation chromatique, la dégradation des ADNs et des membranes plasmiques restantes (perte des phospholipides et des acides gras des membranes). Ces événements, associés à une très forte concentration de ROS dans la cellule, interviennent dans un stade extrêmement tardif de la sénescence lorsque la mort cellulaire programmée (PCD : Programmed cell death) aboutit au démantèlement complet de la cellule (Lim *et al.*, 2007).

B.III.3 La sénescence : un processus fortement régulé

La sénescence correspond à un processus extrêmement contrôlé dont l'initiation et la progression est dépendante de divers facteurs environnementaux et endogènes.

B.III.3.a Les facteurs environnementaux régulant la sénescence : stress abiotiques et biotiques

Tout au long de leur développement les plantes sont soumises à de nombreux stress abiotiques et biotiques, particulièrement en conditions de plein champ (Gregersen *et al.*, 2013). Ces stress conduisent généralement à une modification du métabolisme de la plante, telle qu'une initiation précoce de la sénescence, pouvant provoquer une perte de la productivité des cultures (Bray *et al.*, 2000). Les principaux stress abiotiques et biotiques sont brièvement décrits dans ce chapitre.

Le **stress hydrique** correspond au principal facteur environnemental pouvant avoir un impact très négatif sur le rendement des cultures. De plus, dans le contexte actuel de réchauffement climatique, la fréquence des phénomènes de sécheresse risque d'augmenter à l'avenir (Chaves *et al.*, 2002). Par ailleurs, un stress hydrique peut induire la sénescence aboutissant à un maintien de la balance hydrique de la plante et à une remobilisation des nutriments mais provoque également une perte de rendement (Zhang et Zhou, 2013). De plus, le stress hydrique peut provoquer une stimulation de l'activité protéolytique chez le colza (Ilami *et al.*, 1997) mais aussi une augmentation de l'expression de gènes codant pour des protéases associées à la sénescence (Koizumi *et al.*, 1993).

La **lumière** est un paramètre essentiel au développement des plantes car elle est particulièrement requise pour la photosynthèse. Ainsi un éclairage insuffisant ou excessif, peut induire une sénescence précoce par son action sur la photosynthèse et donc sur le ratio C/N (Wingler *et al.*, 2006 ; Gregersen *et al.*, 2013 ; Zhang et Zhou, 2013). En effet, l'obscurité peut provoquer une diminution de la teneur en chlorophylles, une nette diminution de l'activité photosynthétique et encore un désassemblage des composants cellulaires (Fujiki *et al.*, 2001 ; Weaver et Amasino 2001 ; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). L'obscurité peut provoquer l'induction de gènes SAGs (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005 ; Guo et Gan, 2012) et l'augmentation de l'expression de protéases associées à la sénescence chez différentes espèces (Lin et Wu, 2004 ; Zelisko et Jackowski, 2004 ; Zelisko *et al.*, 2005 ; Roberts *et al.*, 2006 ; 2011). Au cours du cycle de culture, la proximité entre plantes peut fournir un ombrage trop important aux feuilles présentes en bas du couvert et ainsi aboutir à une sénescence précoce de ces feuilles (Gregersen *et al.*, 2013). Néanmoins, chez le colza, la sénescence foliaire peut être retardée par l'ombrage (Brunel-Muguet *et al.*, 2013). Par ailleurs, un excès de lumière ainsi qu'une **élévation de la**



Figure B-16: Nécrose et chlorose sur des feuilles de colza. provoquées par une concentration élevée en O_3 . (Vandermeiren *et al.*, 2009).

température peut provoquer des dommages au niveau de l'appareil photosynthétique et une production de ROS déclenchant une sénescence précoce (Suzuki *et al.*, 2012 ; Gregersen *et al.*, 2013).

L'**ozone** est également un facteur déclenchant la sénescence par le biais d'un stress oxydatif (Zhang et Zhou, 2013). En effet, une exposition à un niveau élevé de pollution O₃ provoque de nombreux changements physiologiques au sein des cultures de colza tel qu'une induction de la sénescence pouvant aboutir à des pertes de rendements *via* des dommages provoqués aux feuilles (**Figure B-16**) et des diminutions des capacités photosynthétiques (Vandermeiren *et al.*, 2009).

La **disponibilité en nutriments**, particulièrement en N, est également un facteur important pouvant réguler la sénescence (Guo et Gan, 2005 ; Gregersen *et al.*, 2013). En effet, une limitation en N peut provoquer une sénescence accélérée (Guo et Gan, 2005 ; Gregersen *et al.*, 2013). Chez le colza, une limitation en N provoque une accélération de la sénescence associée à une diminution de la teneur en chlorophylles et en protéines (Gombert *et al.*, 2006 ; Etienne *et al.*, 2007 ; Gombert *et al.*, 2010 ; Desclos *et al.*, 2009 ; Girondé *et al.*, 2015a, b). Au contraire, un excès en N peut permettre de ralentir la sénescence (Gregersen, 2011). La limitation en N provoquerait une modification du ratio C/N impliqué dans l'initiation de la sénescence (Wingler *et al.*, 2006). Ainsi, le statut nutritionnel de la plante a une forte importance sur la régulation de la sénescence et ceci est fortement corrélé au contrôle du développement de la plante par les phytohormones (Gregersen *et al.*, 2013).

Les stress biotiques tels que les **infections pathogènes** (bactéries, virus, champignons) ainsi que les **infestations de ravageurs** peuvent également réguler la sénescence (Gregersen *et al.*, 2013 ; Fagard *et al.*, 2014 ; Diaz-Mendoza *et al.*, 2016). En effet, ces stress influencent la sénescence foliaire *via* une modulation du métabolisme de la plante en régulant les balances phytohormonales (Diaz-Mendoza *et al.*, 2016). De nombreuses études ont démontré qu'une attaque par un pathogène peut provoquer la modification de l'expression de nombreux gènes tels que les SAGs ou des gènes codant des protéases lors de la réaction hypersensible de défense de la plante (Pontier *et al.*, 1999 ; Espinoza *et al.*, 2007 ; Fagard *et al.*, 2014 ; Fernandez-Calvino *et al.*, 2015). Par exemple, l'expression de SAG12 est induite lors de la réaction hypersensible provoquée par une attaque virale et bactérienne chez le tabac (Pontier *et al.*, 1999) ou par une infestation par un hémiptère (aleurode du tabac) chez *A. thaliana* (Kempema *et al.*, 2007). De plus, chez *A. thaliana*, l'expression de deux protéases (une cystéine protéase et aspartate protéase) est à la fois induite lors de la sénescence et lors de la réaction hypersensible provoquée par un virus (Espinoza *et al.*, 2007).

Finalement, il existe une très forte relation entre les stress biotiques et abiotiques. En effet, les faiblesses provoquées par les stress abiotiques sensibilisent les plantes aux stress biotiques (Prasch et Sonnewald, 2013) pouvant ainsi amplifier les phénomènes provoqués par ces deux types de stress.

B.III.3.b Les facteurs endogènes (sucres et ROS)

Plusieurs types de facteurs endogènes régulent la sénescence mais il est souvent difficile de déterminer avec précision si la sénescence induit des changements de ces facteurs ou l'inverse (Guo et Gan, 2005). Les principaux facteurs endogènes qui ne sont pas de nature hormonale et qui peuvent réguler la sénescence sont brièvement décrits dans ce chapitre. Un chapitre plus complet sera consacré aux phytohormones et en supplément de ces chapitres, les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la sénescence seront décrits plus précisément dans le chapitre §B.IV.4.

B.III.3.b.1 Les sucres (ratio C/N)

Les **sucres** agissent comme molécule signal à diverses étapes du cycle de développement de la plante (Rolland *et al.*, 2002 ; Zhang et Zhou, 2013) et particulièrement dans la feuille qui correspond à l'organe principal de synthèse des composés glucidiques *via* la photosynthèse.

Plusieurs études ont démontré qu'une accumulation de sucres dépassant un seuil défini dans les feuilles provoque une diminution des capacités photosynthétiques ainsi qu'un déclenchement des processus de sénescence (Quirino *et al.*, 2000 ; Rolland *et al.*, 2002). En effet, lors de la sénescence, les concentrations en glucose et fructose augmentent tandis qu'un ajout de glucose permet d'induire les phénomènes de sénescence chez *A. thaliana* (Masclaux *et al.*, 2000 ; Guo et Gan, 2005 ; Winkler *et al.*, 2006). Ce signal sucre serait à la fois associé au rétrocontrôle négatif des sucres sur l'expression des gènes de la photosynthèse mais également au rôle de l'enzyme hexokinase (HXK) jouant un rôle de « signal sucre » (Rolland *et al.*, 2002 ; Guo et Gan, 2005 ; Zhang et Zhou, 2013). En effet, des plantes de tomates surexprimant l'enzyme HXK d'*A. thaliana* sont plus sensibles aux sucres et présentent une sénescence foliaire précoce (Dai *et al.*, 1999). Au contraire, des mutants KO *hvk1* d'*A. thaliana* présentent un retard de sénescence même en présence de fortes concentration en sucres (Moore *et al.*, 2003) démontrant ainsi le rôle complexe des sucres mais également des senseurs de sucres dans la cellule.

De plus le **ratio C/N** est également à prendre en considération lors de la sénescence. En effet, la sénescence peut être induite par une forte teneur en C associée à une faible teneur en N soit un fort ratio C/N (Winkler *et al.*, 2006 ; Aoyama *et al.*, 2014 ; Chen *et al.*, 2015). En effet, une limitation en N minéral induit plus fortement la sénescence lorsqu'elle est combinée à un ajout de glucose (Winkler *et al.*, 2006).

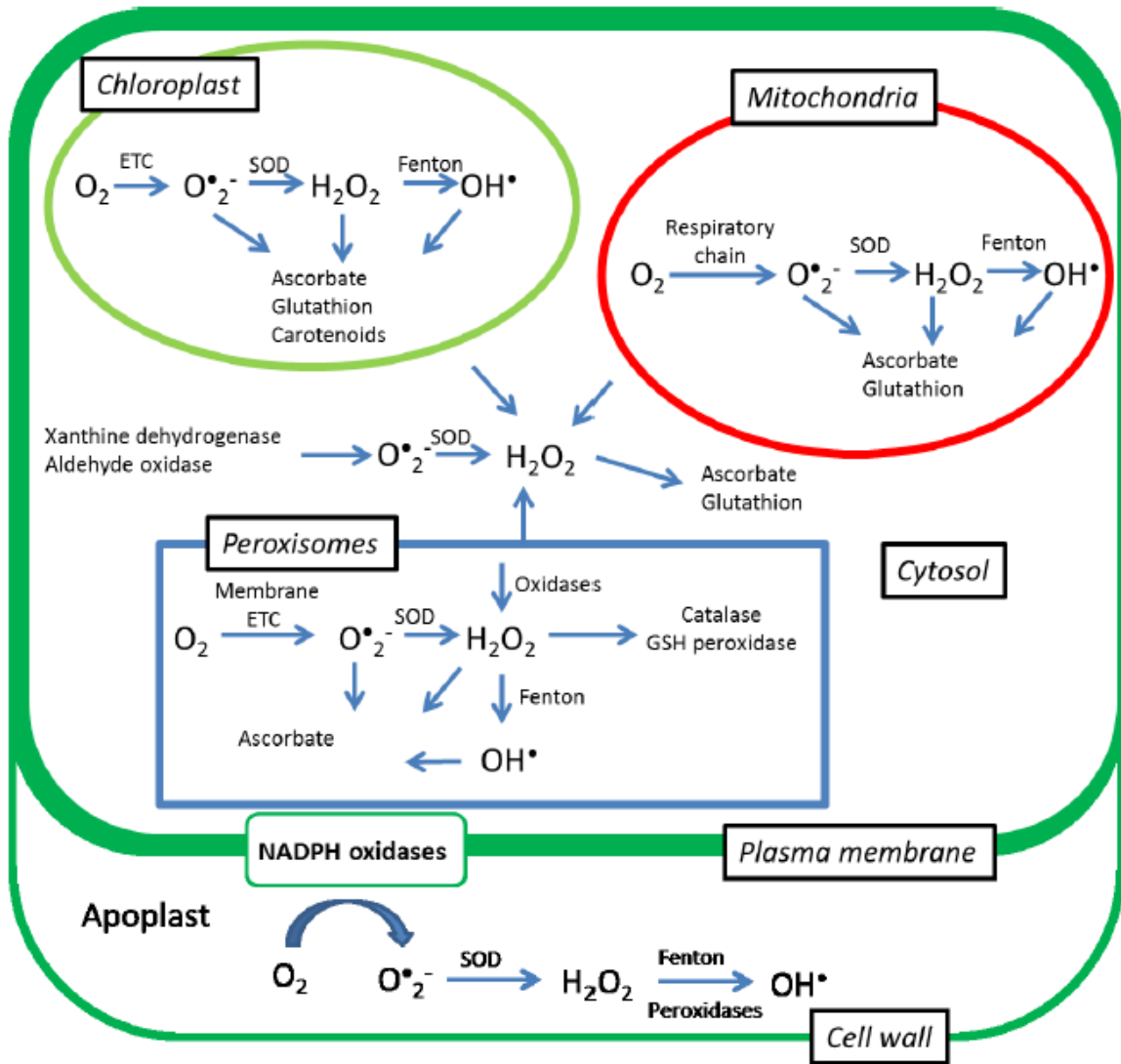


Figure B-17: Production et détoxification des ROS au sein d'une cellule végétale non stressée. SOD: superoxyde dismutase; Fenton: réaction dépendante du Fer permettant la décomposition du peroxyde d'hydrogène; ETC: chaîne de transfert des électrons. (Jajic *et al.*, 2015).

B.III.3.b.2 Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les **espèces réactives de l'oxygène** (ROS) les plus présentes dans les cellules foliaires correspondent au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et aux radicaux libres tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et l'hydroxyle (OH^{\bullet}). L'accumulation de ROS est l'une des premières réponses de la plante soumise à divers stress biotiques ou abiotiques mais également lors de la sénescence naturelle (Khanna-chopra, 2012). Les ROS sont, par ailleurs, de puissants oxydants toxiques pour la cellule. Lorsqu'ils sont en excès, les ROS peuvent engendrer de nombreux dommages à l'ADN, aux protéines, aux lipides membranaires mais également inactiver des enzymes et altérer l'expression des gènes (Zhang et Zhou, 2013 ; Jajic *et al.*, 2015). Dans des conditions physiologiques normales, la production de ROS est maintenue à un faible niveau par des phénomènes de détoxification chimique (glutathion, ascorbate, vitamine E, caroténoïdes, anthocyanes et flavonols) ou enzymatique (catalase, peroxydase, glutathion-S-transférase ou les superoxydes dismutases) (**Figure B-17**) (Mittler *et al.*, 2004 ; Jajic *et al.*, 2015). Par ailleurs, lorsque la production de ROS dépasse largement les capacités détoxifiantes de la plante, celle-ci subit un stress oxydatif qui peut aboutir à la mort des cellules (Gan, 2007).

De nombreuses études ont permis d'associer la production de ROS et les phénomènes de sénescence qu'elle soit naturelle ou induite par différents stress. En effet, lors de la sénescence naturelle, la production de $O_2^{\bullet-}$ augmente chez le pois (McRae *et al.*, 1983 ; Pastori et Del Rio, 1997). Par ailleurs, la production excessive d' H_2O_2 peut être associée à la dégradation de macromolécules mais entraîne également une augmentation de l'expression de gènes *SAGs* et de gènes codant des facteurs de transcription NAC associés à la régulation de la sénescence (décrits dans le chapitre §B.IV.4 (Jajic *et al.*, 2015). Enfin, l' H_2O_2 peut interférer avec d'autres molécules dites « signales » jouant un rôle dans la sénescence telles que l'éthylène ou l'acide abscissique (Jubany-Mari *et al.*, 2009 ; Chen *et al.*, 2012).

B.III.3.c Les phytohormones

Parmi les facteurs endogènes, de nombreuses hormones sont impliquées dans la régulation négative ou positive de la sénescence foliaire. Elles peuvent jouer un rôle à toutes les étapes de sénescence que ce soit l'initiation, la progression ou la phase finale de la sénescence (Lim *et al.*, 2007 ; Jibrán *et al.*, 2013 ; Kusaba *et al.*, 2013 ; Sarwat *et al.*, 2013 ; Zhang et Zhou, 2013). Le rôle de ces hormones lors de la sénescence est résumé de façon non exhaustive dans les paragraphes suivants.

Tableau B-1: Mises en évidence de l'implication des cytokinines (CK) lors de la régulation négative de la sénescence. Sn : sénescence naturelle ; Obs : obscurité ; KO : Knock Out.

Phytohormones	Modification(s)	Effet(s)	Sénescence	Organisme	Référence(s)
Cytokinines CKs	-	Diminution de la concentration en CK lors de la sénescence	Sn	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Khan <i>et al.</i> , 2014
	-	Retard de la sénescence ; Augmentation du rendement	Sn	<i>Brassica napus</i>	Kant <i>et al.</i> , 2015
	-	Retard de la sénescence ; Modification de l'huile	Obs	<i>Zanthoxylum piperitum</i>	Zeng <i>et Zhao</i> , 2016
	<i>IPT</i> surexpression	Retard de sénescence ; Photosynthèse plus longue ; Augmentation de 50% de la biomasse sèche	Sn	<i>Nicotiana tabacum</i>	Gan <i>et Amasino</i> , 1995 ; Jordi <i>et al.</i> , 2000
	-	Augmentation du nombre de graines et de panicules	Sn	<i>Oryza sativa</i>	Lin <i>et al.</i> , 2002 ; Liu <i>et al.</i> , 2010
	Application exogène de CKs	Augmentation de la concentration endogène de CK ; Retard de sénescence ; Induction de la remobilisation des nutriments	Sn	<i>Nicotiana tabacum</i>	Balibrea Lara <i>et al.</i> , 2004 ; Sarwat <i>et al.</i> , 2013
-	<i>farnesyl diphosphate synthase (FPS)</i> surexpression	Accélération de la sénescence ; Diminution de la concentration en CKs ; Diminution de la teneur en isopentenyl di-P ; Induction du gène <i>SAG12</i>	Sn	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Masferrer <i>et al.</i> , 2002
-	KO <i>AHK3</i>	Insensibilité aux CK ; Sénescence précoce	Sn	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Horak <i>et al.</i> , 2008

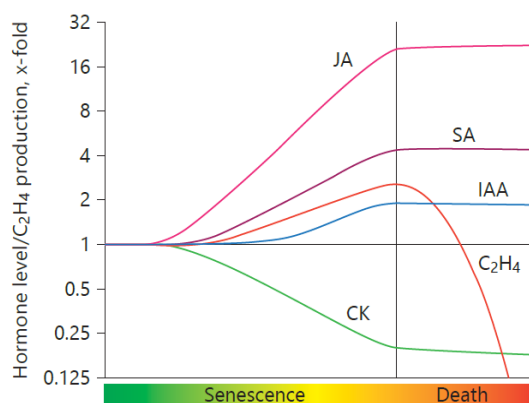


Figure B-18 : Changements de la production d'éthylène et des niveaux de jasmonate (JA), d'acide salicylique (SA), d'auxine (IAA) et de cytokinine (CK) lors de la sénescence foliaire chez *Arabidopsis thaliana*. (Khan *et al.*, 2014).

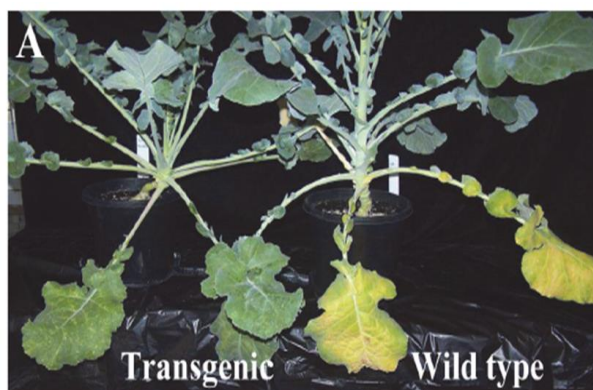


Figure B-19: Sénescence foliaire chez un surexprimeur *IPT* comparé à un génotype non transformé de colza. Transgenic: surexprimeur *IPT*; WT: colza sauvage non transformé. (Kant *et al.*, 2015).

B.III.3.c.1 Les phytohormones régulant négativement la sénescence

Les cytokinines (CKs), les gibbérellines (GAs) et l'auxine (IAA) correspondent à des hormones régulant négativement la sénescence (Jibrán *et al.*, 2013 ; Guo et Gan, 2014 ; Mueller-Roeber et Balazadeh, 2014 ; Kant *et al.*, 2015 ; Zeng et Zhao, 2016).

De nombreuses études ont démontré l'effet retardateur de la sénescence provoqué par les **cytokinines** (CKs) (**Tableau B-1**). En effet, la concentration de CKs diminue pendant la sénescence chez *A. thaliana* (**Figure B-18** ; Khan *et al.*, 2014). Par ailleurs, la surexpression d'un gène codant l'une des enzymes principales impliquée lors de la biosynthèse des CKs, l'isopentenyltransférase (IPT), associée à un promoteur *SAG12* spécifique de la sénescence ou *35S*, provoque un retard de sénescence chez le colza mais également chez d'autres espèces comme le poivre chinois ou encore le tabac et le riz (**Figure B-19**) (Kant *et al.*, 2015 ; Zeng et Zhao, 2016). Cette surexpression permet également d'augmenter la biomasse, le rendement ou de modifier la composition en huile des graines chez le colza de printemps (Kant *et al.*, 2015). De plus, l'application exogène de CKs induit une augmentation de la production endogène, provoque un retard de la sénescence et une remobilisation des éléments nutritifs chez le tabac (Balibrea Lara *et al.*, 2004 ; Sarwat *et al.*, 2013). À l'inverse, la surexpression de l'enzyme farnesyl diphosphate synthase (FPS) qui provoque une diminution des teneurs endogènes en CKs de type zéatine et des substrats nécessaires à la synthèse de CKs tels que l'isopentenyl diphosphate, induit une sénescence précoce et l'expression du gène *SAG12* chez *A. thaliana* (Masferrer *et al.*, 2002). Par ailleurs, le mécanisme permettant aux CKs de moduler la sénescence chez *A. thaliana* semble être dépendant de différentes molécules telles que des « arabidopsis histidine protein kinases » (AHK3), des « arabidopsis histidine phosphotransfer proteins » (AHPs) et des « arabidopsis response regulators » (ARRs) (Lim *et al.*, 2007 ; Khan *et al.*, 2014) (**Figure B-20**). En effet, un mutant d'*A. thaliana* caractérisé par une perte de fonction AHK3 présente une insensibilité aux CKs et également une sénescence accélérée (Horak *et al.*, 2008).

Un rôle de régulateur négatif de la sénescence a également été démontré pour les **gibbérellines** (GAs) (Schippers *et al.*, 2007 ; Jibrán *et al.*, 2013 ; Sarwat *et al.*, 2013) (**Tableau B-2**). En effet, la concentration en GAs diminue dans les feuilles de *Lactuca sativa* durant la sénescence (Jibrán *et al.*, 2013). De plus, une application exogène d'une forme active de GAs (GA₃) induit une augmentation des concentrations endogènes de GAs et aboutit à un ralentissement de la sénescence et de la dégradation des protéines chez *Paris polyphylla* (Li *et al.*, 2010). À contrario, l'application d'un inhibiteur de la synthèse des GAs (paclobutrazol) induit une accélération de la sénescence. Néanmoins les GAs ne semblent pas avoir un rôle direct sur la régulation de la sénescence mais plutôt un rôle antagoniste à l'acide abscissique, régulateur positif de la sénescence (Yu *et al.* 2009 ; Sarwat *et al.*, 2013).

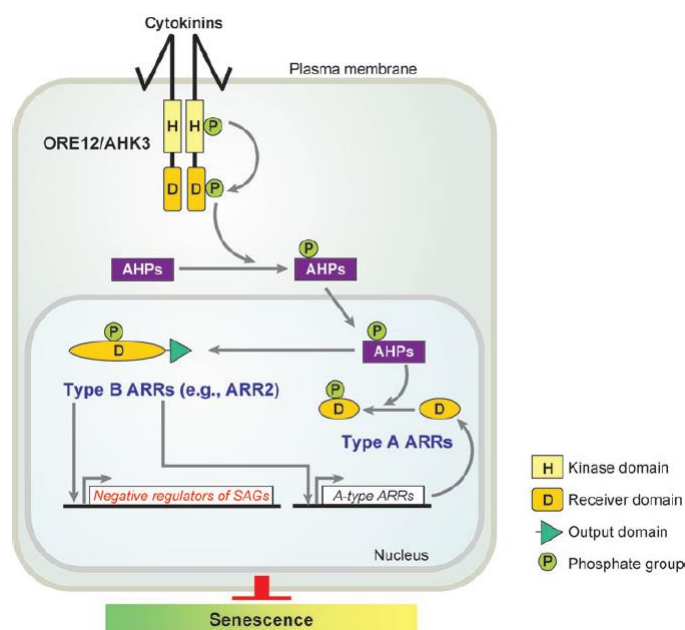


Figure B-20: Modèle hypothétique représentant le rôle des cytokinines dans la régulation négative de la sénescence foliaire chez *Arabidopsis thaliana*. AHK: Arabidopsis histidine protein kinase; AHP: Arabidopsis histidine phosphotransfer protein; ARR: Arabidopsis response regulator. (Lim *et al.*, 2007).

Tableau B-2: Mises en évidence de l'implication des gibbérellines (GAs) et des auxines (IAAs) lors de la régulation de la sénescence. Sn : sénescence naturelle ; KO : Knock out.

Phytohormones	Modification(s)	Effet(s)	Sénescence	Organisme	Référence(s)
	-	Diminution de la concentration en GA lors de la sénescence	Sn	<i>Lactuca sativa</i>	Jibran <i>et al.</i> , 2013
GAs	Application exogène de GA ₃	Ralentissement de la sénescence et de la dégradation des protéines	Sn	<i>Paris polyphylla</i>	Li <i>et al.</i> , 2010
	Inhibiteur de GA	Accélération de la sénescence	Sn	<i>Paris polyphylla</i>	Li <i>et al.</i> , 2010
	Haut niveau IAA endogène	Ralentissement de la sénescence et de l'expression du gène <i>SAG12</i>	Sn	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Kim <i>et al.</i> , 2011
IAA	KO SAUR36	Retard de sénescence	Sn	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hou <i>et al.</i> , 2013
	KO ARF2	Retard de sénescence	Sn	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ellis <i>et al.</i> , 2005

Même si un rôle de régulation négative de la sénescence a été démontré pour les **auxines** (IAA), l'action des auxines (IAA) dans la sénescence n'est pas clairement établie (**Tableau B-2**). En effet, chez *A. thaliana*, un haut niveau d'IAA endogène provoque un retard de la sénescence corrélé à une répression du gène *SAG12* (Kim *et al.*, 2011). Néanmoins, toujours chez *A. thaliana*, le gène SAUR36 (« SMALL AUXIN UP RNA Gene ») induit par l'auxine est surexprimé au cours de la sénescence tandis qu'un dysfonctionnement de SAUR36 retarde la sénescence (Hou *et al.*, 2013). De plus, une mutation du gène codant le facteur de transcription ARF2 (« auxine reponse factor 2 ») induit un ralentissement de la sénescence chez *A. thaliana* (Ellis *et al.*, 2005). Le rôle des auxines n'est donc pas clairement déterminé ; elle pourrait plutôt être associée à une balance hormonale *via* son action antagoniste avec l'éthylène comme lors des phénomènes d'abscission (Sexton et Roberts, 1982 ; Schippers *et al.*, 2007).

B.III.3.c.2 Les phytohormones régulant positivement la sénescence

Au contraire des hormones présentées précédemment, l'acide abscissique (ABA), l'acide salicylique (SA), l'éthylène (ET), le méthyl-jasmonate (MeJA), les brassinostéroïdes (BR) et les strigolactones (SL) correspondent à des hormones régulant positivement la sénescence (Lim *et al.*, 2007 ; Jibrán *et al.*, 2013 ; Khan *et al.*, 2014 ; Kusaba *et al.*, 2013 ; Sarwat *et al.*, 2013).

Le rôle promoteur de l'**acide abscissique** (ABA) lors de la sénescence a été démontré de nombreuses fois chez diverses espèces (**Tableau B-3**). En effet, de nombreux gènes impliqués dans la synthèse de l'ABA ou dans le signal lié à l'ABA sont surexprimés durant la sénescence (Breeze *et al.*, 2011) et les concentrations endogènes d'ABA augmentent durant la sénescence chez de nombreuses espèces telles qu'*A. thaliana* ou encore chez le maïs (He *et al.*, 2005 ; Breeze *et al.*, 2011). Un apport exogène d'ABA chez *A. thaliana* induit l'expression de gènes *SAGs* mais également la production de H₂O₂ impliqué dans la sénescence (Weaver *et al.*, 1998 ; Lim *et al.*, 2007). Par ailleurs, de nombreux mutants d'*A. thaliana* ont été utilisés pour valider le rôle de l'ABA lors de la sénescence. Par exemple, des mutants insensibles à l'ABA, présentent un phénotype « stay-green » avec un ralentissement de la sénescence (mutants *rpk1*, **Figure B-21**, Lee *et al.*, 2011 ; mutants *SAG113*, Zhang et Gan, 2012).

L'**acide salicylique** (SA) a un également un rôle accélérateur de la sénescence (**Tableau B-3**). En effet, la concentration en SA augmente durant la sénescence foliaire chez *A. thaliana* (**Figure B-18** ; Khan *et al.*, 2014). De nombreux gènes impliqués dans la synthèse de SA sont induits durant la sénescence chez *A. thaliana* (van der Graaff *et al.*, 2006). Par ailleurs, un traitement SA chez *A. thaliana* permet la surexpression de *SAGs* (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005 ; Morris *et al.*, 2000) incluant des gènes codant des protéases de type « vacuolar processing enzymes » (α VPE et γ VPE) (Jibrán *et al.*, 2013). De plus, Morris *et al.* (2000) ont démontré qu'un

Tableau B-3: Mises en évidence de l'implication de l'acide abscissique (ABA) et de l'acide salicylique (SA) lors de la régulation positive de la sénescence. *Sn* : sénescence naturelle ; *Obs* : obscurité ; *KO* : Knock out.

Phytohormones	Modification(s)	Effet(s)	Sénescence	Organisme	Référence(s)
ABA	-	Des gènes impliqués dans la synthèse de l'ABA sont induits durant la sénescence et les concentrations en ABA augmentent lors de la sénescence	Sn	<i>Arabidopsis thaliana</i> et <i>Zea mays</i>	He <i>et al.</i> , 2005 ; Breeze <i>et al.</i> , 2011
	Apport exogène d'ABA	Induction de l'expression de gènes SAG; Production de ROS	Sn	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Weaver <i>et al.</i> , 1998 ; Lim <i>et al.</i> , 2007
	KO <i>rpk1</i>	Insensibilité à l'ABA ; Phénotype de type stay-green	Sn	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Lee <i>et al.</i> , 2011
	KO <i>SAG113</i>	Insensibilité à l'ABA ; Phénotype de type stay-green	Sn	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Zhang et Gan, 2012
SA	-	Des gènes impliqués dans la synthèse de SA sont induits durant la sénescence et les concentrations en SA augmentent lors de la sénescence	Sn	<i>Arabidopsis thaliana</i>	van der Graaff <i>et al.</i> , 2006 ; Khan <i>et al.</i> , 2014
	Apport exogène de SA	Surexpression de gènes SAG tels que α VPE et γ VPE	Sn	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Buchanan-Wollaston <i>et al.</i> , 2005 ; Morris <i>et al.</i> , 2000 ; Jibrán <i>et al.</i> , 2013
	KO <i>npr1</i> ou <i>pad4</i>	Déficients dans la synthèse de SA ; Retard de la sénescence ; Diminution de l'expression de <i>SAG12</i>	Sn	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Morris <i>et al.</i> , 2000

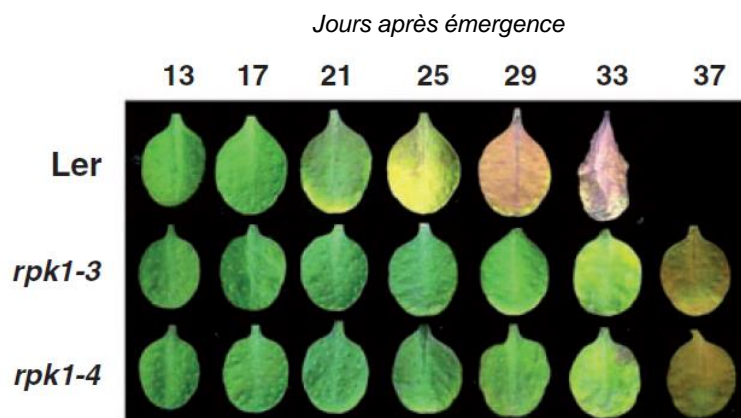


Figure B-21: Ralentissement de la sénescence naturelle observé chez des mutants *RPK1* (*rpk1-3* ; *rpk1-4*) par rapport au génotype sauvage d'*Arabidopsis thaliana* (Ler). Les chiffres représentent les jours après émergence. (D'après Lee *et al.*, 2011).

défaut au niveau de la synthèse de SA chez *A. thaliana* entraîne un retard de la sénescence et une diminution de l'expression du gène *SAG12*, marqueur de la sénescence. Le SA est également impliqué dans les phénomènes d'autophagie aboutissant à la dégradation des vacuoles et des composants cytoplasmiques (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2014).

L'**éthylène** (ET) correspond également à une phytohormone régulant positivement la sénescence (**Tableau B-4**). En effet, l'ET est une phytohormone gazeuse dont la production est associée à l'initiation de la sénescence chez *A. thaliana* (**Figure B-18** ; Khan *et al.*, 2014). L'expression de nombreux gènes de la synthèse ou du signal de l'éthylène sont induits durant la sénescence foliaire chez *A. thaliana* (van der Graaff *et al.*, 2006) et l'application exogène d'ET provoque une sénescence foliaire précoce (Jing *et al.*, 2005 ; Koyama, 2014). Par ailleurs, le niveau d'ET appliqué et l'âge de l'organe sont des facteurs importants pour la réponse à l'ET (Jing *et al.*, 2005). En effet, ces auteurs ont démontré qu'une application trop longue d'ET (durant 16h) a un effet moins important sur l'initiation de la sénescence qu'une application de seulement 12h. De plus, seule une application sur des feuilles matures déclenchera une sénescence précoce par rapport à une application sur des jeunes feuilles, démontrant ainsi une réponse âge-dépendante de l'organe à l'ET. Il est également intéressant de signaler que des mutants d'*A. thaliana*, insensibles à l'ET présentent un phénotype « stay-green » (**Tableau B-4** ; mutant *etr1-1* : Grbić et Blecker, 1995 ; mutant *ein2/ore3* : Oh *et al.*, 1997 ; mutant *acs* : Tsuchisaka *et al.*, 2009). L'ET serait impliqué dans la régulation de facteurs de transcription de type NAC (décrits dans le chapitre §B.IV.4) tel que ORE1 impliqué dans la régulation de *SAGs* (Khan *et al.*, 2014). Enfin, de récents travaux ont démontré que la production d'éthylène était fortement augmentée lors d'une limitation en N chez *A. thaliana* (De Gernier *et al.*, 2016). Lors de cette étude, la mesure précise de la production d'ET, *via* un détecteur laser photo-acoustique, a permis d'observer une variation naturelle de la production d'ET chez différentes accessions d'*A. thaliana* sous faibles apports azotés. Cette variation pourrait être exploitée dans le but d'améliorer l'EUA en manipulant le « timing » de la sénescence sous limitation azotée (De Gernier *et al.*, 2016).

L'**acide jasmonique** (JA) et son dérivé, le **méthyl jasmonate** (MeJA), sont également des phytohormones régulant positivement la sénescence (**Tableau B-4**). En effet, la concentration en JA augmente durant la sénescence foliaire chez *A. thaliana* (**Figure B-18** ; He *et al.*, 2002 ; Seltmann *et al.*, 2010 ; Khan *et al.*, 2014). De plus, de nombreux gènes associés à la synthèse de JA sont induits durant la sénescence foliaire chez *A. thaliana* (van der Graaff *et al.*, 2006 ; Breeze *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'application exogène de MeJA se traduit par une induction de la sénescence foliaire chez *A. thaliana* (He *et al.*, 2002) et chez le colza (Rossato *et al.*, 2002 ; Desclos *et al.*, 2008) en association avec une stimulation de la remobilisation du N dans les

Tableau B-4: Mises en évidence de l'implication de l'éthylène (ET) du jasmonate (JA), du méthyl jasmonate (MeJA) des brassinostéroïdes (BR) et des strigolactones (SL) lors de la régulation positive de la sénescence. Sn : sénescence naturelle ; Obs : obscurité ; KO : Knock out

Phytohormones	Modification(s)	Effet(s)	Sénescence	Organisme	Référence(s)
Ethylène (ET)	-	Des gènes impliqués dans la synthèse de ET sont induits durant la sénescence et la production de ET augmente lors de la sénescence	Sn	<i>Arabidopsis thaliana</i>	van der Graaff <i>et al.</i> , 2006 ; Khan <i>et al.</i> , 2014
	Application exogène de ET	Senescence foliaire précoce	Sn	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Jing <i>et al.</i> , 2005 ; Koyama, 2014
	KO <i>etr1-1</i>	Insensible à l'ET ; Phénotype stay-green	Sn	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Grbić et Bleecker, 1995
	KO <i>ein2/ore3</i>	Insensible à l'ET ; Phénotype stay-green	Sn	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Oh <i>et al.</i> , 1997
	KO <i>acs</i>	Insensible à l'ET ; Phénotype stay-green	Sn	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tsuchisaka <i>et al.</i> , 2009
JA et MeJA	-	Des gènes impliqués dans la synthèse de JA sont induits durant la sénescence et la concentration en JA augmente lors de la sénescence	Sn	<i>Arabidopsis thaliana</i>	He <i>et al.</i> , 2002 ; van der Graaff <i>et al.</i> , 2006 ; Seltmann <i>et al.</i> , 2010 ; Breeze <i>et al.</i> , 2011 ; Khan <i>et al.</i> , 2014
	Application exogène de MeJA	Induction de la sénescence foliaire	Sn	<i>Arabidopsis thaliana</i>	He <i>et al.</i> , 2002
	Application exogène de MeJA	Induction de la sénescence foliaire ; Stimulation de la remobilisation du N et de la dégradation des protéines solubles	Sn	<i>Brassica napus</i>	Rossato <i>et al.</i> , 2002 ; Desclos <i>et al.</i> , 2008
BR	KO <i>coi1</i> et <i>kat2</i>	Insensibles au MeJA ; Phénotype stay-green	Obs	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Castillo et Leon, 2008
	KO <i>det2</i>	Phénotype stay-green	Sn	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Chory <i>et al.</i> , 1994 ; Sarwat <i>et al.</i> , 2013
	KO <i>bzr2/bes1</i>	Phénotype stay-green	Sn	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Yin <i>et al.</i> , 2002
SL	KO <i>dad1</i>	Phénotype stay-green	Sn	<i>Petunia hybrida</i>	Snowden <i>et al.</i> , 2005

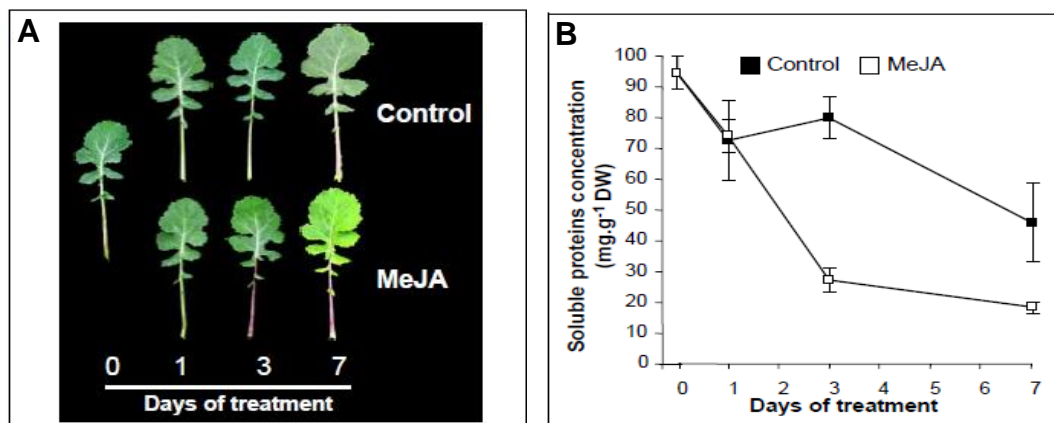


Figure B-22 : Progression de la sénescence foliaire en présence ou absence de MeJA chez le colza d'hiver (cv. Capitoll) (A) Photographies de l'évolution de la sénescence foliaire et (B) Evolution de la concentration en protéines solubles dans les feuilles de colza durant la sénescence naturelle ou induite par le MeJA. (D'après Desclos *et al.*, 2008).

feuilles âgées et une dégradation plus importante des protéines solubles (**Figure B-22**, Desclos *et al.*, 2008). Des mutants d'*A. thaliana*, insensibles au MeJA, présentent un phénotype « stay-green » lors de la sénescence induite par l'obscurité (*coi1* et *kat2* : Castillo et Leon, 2008) tandis que d'autres études démontrent des résultats contradictoires (Schommer *et al.*, 2008). Le JA et MeJA semblent donc importants durant la sénescence mais leur rôle précis reste à déterminer.

Enfin, par rapport aux autres hormones, peu de recherches se sont focalisées sur le rôle des **brassinostéroïdes** (BRs) et des **strigolactones** (SLs). Néanmoins toutes ces études ont démontré un rôle de régulateur positif de ces hormones lors de la sénescence (**Tableau B-4**). En effet, un mutant *det2* (gène codant une enzyme impliquée dans la synthèse des BRs) présente un phénotype « stay-green » chez *A. thaliana* (Chory *et al.*, 1994 ; Sarwat *et al.*, 2013). De plus, chez *A. thaliana*, un mutant *bzr2/bes1*, un facteur de transcription régulant positivement la synthèse de BRs, présente également un phénotype « stay-green » avec un ralentissement de la sénescence (Yin *et al.*, 2002). Par ailleurs, un mutant de pétunia n'exprimant plus *dad1*, déficient dans la synthèse de SLs, présente également un phénotype « stay-green » démontrant ainsi son rôle d'accélérateur de la sénescence foliaire (Snowden *et al.*, 2005).

Cette synthèse des connaissances sur les mécanismes liées à la sénescence et les différents effecteurs susceptibles de réguler la sénescence foliaire fait ressortir que de nombreux facteurs environnementaux ou endogènes peuvent agir directement ou indirectement sur de nombreuses enzymes impliquées dans la protéolyse. Le chapitre suivant sera plus spécifiquement consacré à l'état des connaissances sur les protéases, leurs cibles et leur régulation.

B.IV La protéolyse et la remobilisation du N pendant la sénescence

Il a été démontré dans le chapitre §B.II. que l'amélioration de l'EUA nécessite l'identification des processus protéolytiques et des protéases pouvant être à l'origine d'une meilleure remobilisation des protéines chez certaines variétés de colza que cela soit au stade rosette lors de la sénescence séquentielle ou aux stades reproducteurs lors de la sénescence des enveloppes de siliques. Afin de réaliser cet objectif, il est nécessaire de comprendre les mécanismes protéolytiques associés à la sénescence.

B.IV.1 Les principales protéines source de N

La dégradation des protéines chloroplastidiales représente la source majoritaire du N remobilisé au niveau des cellules du mésophylle. En effet, les chloroplastes contiennent jusqu'à 70% des protéines foliaires (Mae *et al.*, 1983 ; Gan et Amasino, 1997) et les protéines représentent 70-90% du N réduit stocké dans la cellule (Peoples et Dalling, 1988). C'est

pourquoi de nombreuses études se sont focalisées sur cet organite (Schiltz *et al.*, 2004 ; Keech *et al.*, 2007 ; Avila-Ospina *et al.*, 2014). Il a été démontré que les protéines chloroplastidiales étaient dégradées par deux évènements successifs : une dégradation partielle des protéines à l'intérieur du chloroplaste suivi par une dégradation plus prononcée après perte d'intégrité du chloroplaste (Ono *et al.*, 1995). De plus, les protéines du stroma vont être dégradées plus rapidement que les protéines des thylakoïdes (Kuprinska, 2007 ; Diaz-Mendoza *et al.*, 2016).

Parmi les protéines du **stroma**, la RuBisCO (RBC ; ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase) peut représenter plus de 50% des protéines solubles de la feuille de colza (Desclos, 2008). Il a d'ailleurs été démontré que la RBC fournit la majeure partie du N nécessaire au développement des organes en croissance (Demirevska-Kepova *et al.*, 2005 ; Thoenen *et al.*, 2007) et que l'optimisation du recyclage de la RBC par les protéases est crucial pour l'amélioration de la remobilisation du N (Feller *et al.*, 2008). En effet, dans les feuilles sénescentes chutées de colza, la RBC correspond à l'une des protéines résiduelles majeures (Desclos-Théveniau *et al.*, 2014). Il a été par ailleurs démontré que la dégradation de la RBC est initiée dans les chloroplastes intacts (Zhang *et al.*, 2007 ; Feller *et al.*, 2008) et qu'un fragment de 44kDa issu de cette dégradation s'accumulait dans les chloroplastes isolés de feuilles sénescents de blé (Kokubun *et al.*, 2002 ; Martínez *et al.*, 2008). La GS2 chloroplastidiale est également une protéine très rapidement dégradée dans le chloroplaste avant même la RBC (Thoenen et Feller, 1998). La RBC et la GS2 sont deux protéines plastidiales qui sont retrouvées dans les SAVs « senescence-associated vesicles » enrichies en cystéine protéases et semblent être des cibles majeures de ces protéases (Martínez *et al.*, 2008 ; Prins *et al.*, 2008 ; Carrión *et al.*, 2013, 2014).

Parmi les protéines des **thylakoïdes**, le photosystème II (PSII) représente plus de 30% des protéines chloroplastidiales (Matile, 1992 ; Simova-Stoilova *et al.*, 2010), c'est-à-dire le second pool de N remobilisable à partir des chloroplastes (Diaz-Mendoza *et al.*, 2016). En effet, la protéine D1 ou encore les protéines du LHCII « Light harvesting complex II » du photosystème II (telles que les Lhcb1-3) peuvent représenter jusqu'à 20% du N foliaire (Matile *et al.*, 1996) et sont les cibles de protéases associées à la sénescence telles que des sérine protéases ou des métalloprotéases (Srivalli *et al.*, 2001 ; Kato et Sakamoto, 2009 ; Wagner *et al.*, 2011). Par ailleurs, une étude récente a démontré qu'une protéolyse efficace au sein des feuilles de colza, particulièrement une dégradation efficace de la protéine D1, était nécessaire pour atteindre une forte ERA foliaire (Girondé *et al.*, 2016).

Ces protéines chloroplastidiales représentent donc les sources majeures de N remobilisable vers les organes en croissance. Leur dégradation par diverses protéases durant la sénescence est

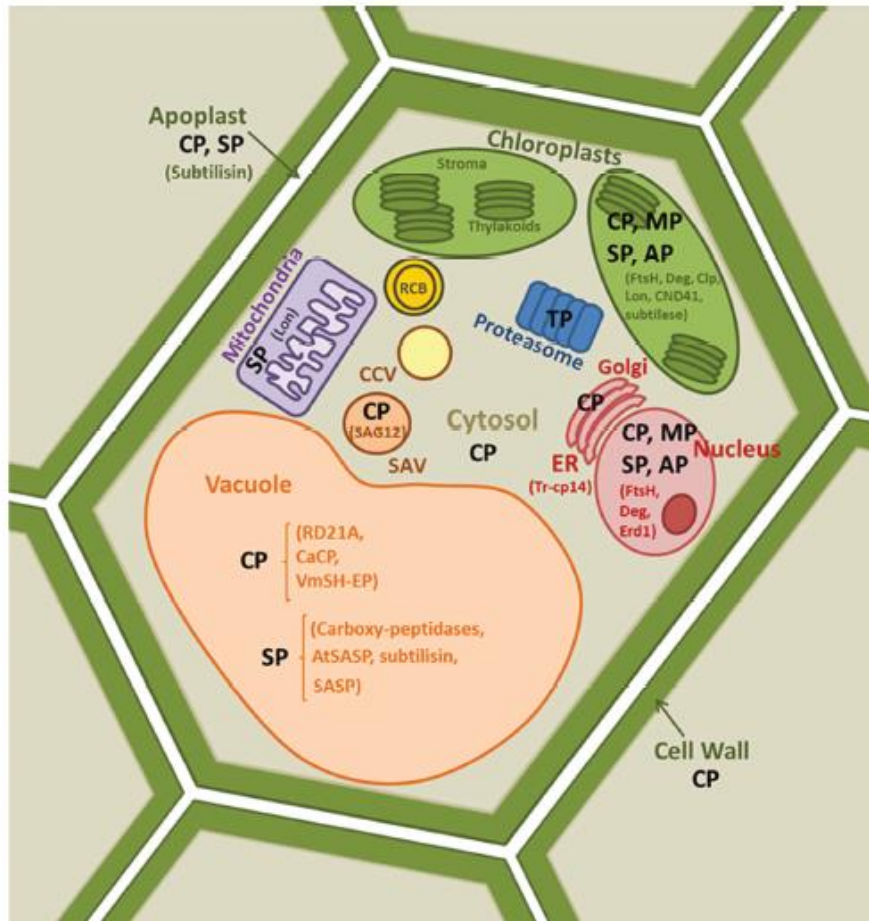


Figure B-23 : Localisation cellulaire des protéases associées à la sénescence. Différentes classes de protéases sont présentées. CP: cystéine protéases ; SP: sérine protéases ; MP: métalloprotéases ; TP: thréonine protéases et AP: protéases à aspartate. Des membres de chaque classe sont également présentés. ER: réticulum endoplasmique ; RCB: RuBisCO containing bodies ; SAV: senescence-associated vesicles ; CCV : Chloroplast containing vesicles. (Díaz-Mendoza *et al.*, 2016).

cruciale. Ainsi, la compréhension et l'optimisation de la protéolyse de ces protéines plastidiales durant la sénescence est une piste prometteuse en vue d'améliorer l'ERA chez le colza.

B.IV.2 Les acteurs de la protéolyse : Les protéases

Il existe plus de 800 protéases identifiées dans les différents génomes de plantes (Rawlings *et al.*, 2016). Les protéases peuvent dégrader leur substrat à partir d'une extrémité de la protéine (exopeptidases) ou à l'intérieur de la chaîne polypeptidique (endopeptidases) (Barrett, 1994). Ces dernières sont classées suivant la nature de leur mécanisme catalytique (acide aminé du site actif). Parmi les endopeptidases, ce sont les protéases à cystéine et à sérine qui sont le plus fortement associées à la sénescence foliaire chez différentes espèces (Bhalerao *et al.*, 2003 ; Roberts *et al.*, 2012 ; Diaz et Martinez, 2013 ; Diaz-Mendoza *et al.*, 2014 ; Kidric *et al.*, 2014a). Les protéases à aspartate, à thréonine et les métallo-protéases participent également au processus de sénescence mais leur rôle est moins documenté (Roberts *et al.*, 2012).

Les parties suivantes résument de façon non exhaustive les principales connaissances sur l'implication de ces protéases lors de la sénescence. Cette analyse se focalise essentiellement sur les Brassicacées et/ou quelques plantes de grande culture. Elle récapitule les données sur la mise en évidence de l'implication des protéases au niveau transcriptionnel, traductionnel et de leur l'activité.

Les connaissances sur la compartimentation cellulaire des classes de protéases durant la sénescence foliaire sont résumées sur la **Figure B-23** (D'après Diaz-Mendoza *et al.*, 2016). Ces protéases ont en effet été détectées dans différents compartiments cellulaires tels que le noyau, les chloroplastes, le cytosol, le réticulum endoplasmique, les mitochondries, les vacuoles, l'apoplaste ou dans plusieurs vésicules.

B.IV.2.a Les exopeptidases (exoP)

Les exopeptidases sont divisées en deux classes : les aminopeptidases (dégradant les protéines *via* l'extrémité N-terminale) et les carboxypeptidases (dégradation *via* l'extrémité C-terminale). Malgré le fait que ce sont les endopeptidases qui jouent un rôle prépondérant lors de la sénescence, l'implication des exopeptidases lors de la sénescence foliaire a déjà été démontrée.

Au niveau transcriptionnel, lors de la sénescence foliaire naturelle du blé, une induction de plusieurs gènes codant des carboxypeptidases (Gregersen et Holm, 2007) et des aminopeptidases (Gregersen, 2011) a été observée. Buchanan-Wollaston *et al.* (2005) ont également observé l'induction de gènes codant des carboxypeptidases dans les feuilles sénescentes d'*A. thaliana*.

Tableau B-5: Protéases à cystéine (CPs) dont l'expression, l'abondance et/ou l'activité est augmentée durant la sénescence foliaire. CP: Protéase à cystéine non identifiée ; PLCP: Papain-like cystéine protéase non identifiée ; AALP : Aleurain-like non identifiée ; Sn : Sénescence naturelle ; N : stress azoté ; H : stress hydrique ; M : stress mécanique

Protéases à cystéine	Gène	Protéine	Activité	Sénescence	Localisation	Organisme	Référence
	SAG2			Sn		<i>Brassica napus</i>	Noh et Amasino, 1999
	SAG12	SAG12		Sn / N		<i>Brassica napus</i>	Noh et Amasino, 1999 ; Desclos <i>et al.</i> , 2009
			PLCP	Sn / N		<i>Brassica napus</i>	Girondé <i>et al.</i> , 2016
PLCPs	SAG2			Sn		<i>Arabidopsis thaliana</i>	Guo <i>et al.</i> , 2004
	SAG12	SAG12		Sn	SAVs	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Yamada <i>et al.</i> , 2001 ; Grbic, 2003 ; Guo <i>et al.</i> , 2004 ; Otegui <i>et al.</i> , 2005
	RD21	RD21	RD21	Sn	Vacuole, Cytoplasme	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Yamada <i>et al.</i> , 2001 ; Grbic, 2003 ; Guo <i>et al.</i> , 2004 ; van der Hooft <i>et al.</i> , 2004 ; Otegui <i>et al.</i> , 2005 ; Gu <i>et al.</i> , 2012
	RD19			Sn / H	Cytoplasme	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Koizumi <i>et al.</i> , 1993 ; Guo <i>et al.</i> , 2004
	Cathepsin-B			Sn		<i>Arabidopsis thaliana</i>	Guo <i>et al.</i> , 2004
	AALP			Sn		<i>Arabidopsis thaliana</i>	Guo <i>et al.</i> , 2004
	SAG12			N / M		<i>Triticum aestivum</i>	Parrott <i>et al.</i> , 2010
VPEs	α -VPE			Sn	Vacuole	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Kinoshita <i>et al.</i> , 1999 ; Sanmartín <i>et al.</i> , 2005
	γ -VPE			Sn	Vacuole	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Kinoshita <i>et al.</i> , 1999 ; Sanmartín <i>et al.</i> , 2005
Métacaspases	MC6			Sn	Noyau, Cytoplasme	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Breeze <i>et al.</i> , 2011 ; Kwon et Hwang, 2013
	MC9			Sn	Noyau, Cytoplasme	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Breeze <i>et al.</i> , 2011 ; Kwon et Hwang, 2013
Autres	LSC7			Sn		<i>Brassica napus</i>	Buchanan-Wollaston <i>et al.</i> , 1997
	LSC790			Sn		<i>Brassica napus</i>	Buchanan-Wollaston <i>et al.</i> , 1997
	bcp-15			H		<i>Brassica napus</i>	Stroeher <i>et al.</i> , 1997
			CP	Sn		<i>Arabidopsis thaliana</i>	Otegui <i>et al.</i> , 2005
	BoCP5 (AALP)			M (coupe)		<i>Brassica oleracea</i>	Eason <i>et al.</i> , 2005
		CP	M (coupe)		<i>Brassica oleracea</i>	Coupe <i>et al.</i> , 2003	

Par ailleurs, un rôle des aminopeptidases dans la dégradation complète des protéines du stroma du **chloroplaste** lors de la sénescence a été supposé tandis que les carboxypeptidases **vacuolaires** sont absentes des chloroplastes intacts (Feller et Fisher, 1994 ; Hörtensteiner et Feller, 2002 ; van der Hoorn, 2008 ; Roberts *et al.*, 2012).

B.IV.2.b Les protéases à cystéine (CPs)

De nombreuses études ont démontré, chez différentes espèces, que les CPs correspondent à la classe de protéases la plus surexprimée durant la sénescence foliaire naturelle ou induite (Martínez *et al.*, 2007 ; Roberts *et al.*, 2012 ; Diaz-Mendoza *et al.*, 2016) (**Tableau B-5**).

Parmi les CPs, les sous-familles supposées avoir un rôle prépondérant pendant la sénescence correspondent aux Papain-Like Cysteine Protéases (PLCPs), aux Vacuolar Processing Enzymes (VPE) et aux métacaspases (MC).

B.IV.2.b.1 Les PLCPs

Les PLCPs appartiennent à la famille C1A dans la base de données MEROPS (Rawling *et al.*, 2016). Cette famille compte plus de 30 membres chez *A. thaliana* (Beers *et al.*, 2004 ; Garcia-Lorenzo *et al.*, 2006 ; Richau *et al.*, 2012). Les PLCPs sont synthétisées sous forme de pré-protéines inactives présentant un pro-peptide inhibiteur qui doit être clivé afin de rendre la protéase active (van der Hoorn *et al.*, 2011 ; Gu *et al.*, 2012).

Au niveau transcriptionnel, de nombreux gènes codant des PLCPs sont surexprimés lors de la sénescence foliaire naturelle chez le colza (*SAG2*, *SAG12-1* et *SAG12-2*) (Noh et Amasino, 1999) et chez *A. thaliana* (*SAG2*, *SAG12*, *RD21*, *RD19*, *cathepsin-B*, *AALP* (*aleurain-like*)) (Grbic, 2003 ; Guo *et al.*, 2004). Par ailleurs, la sénescence provoquée par un stress hydrique chez *A. thaliana* s'accompagne de la surexpression du gène codant la PLCP RD19 (Koizumi *et al.*, 1993). De plus, une étude durant la sénescence induite par une limitation en N ou par une interruption du phloème à la base de la feuille chez le blé, a mis en évidence une très forte corrélation entre l'expression des gènes codant des PLCPs (*SAG12*) et les facteurs associés à la sénescence tels que la dégradation des chlorophylles et des protéines (Parrott *et al.*, 2010).

Au niveau traductionnel, une accumulation des protéines SAG12 et RD21 a été mise en évidence durant la sénescence foliaire naturelle chez *A. thaliana* (Yamada *et al.*, 2001 ; Grbic, 2003 ; Otegui *et al.*, 2005). Par ailleurs, chez le colza, la sénescence foliaire induite par une limitation en N induit l'accumulation des deux isoformes de SAG12 (Desclos *et al.*, 2009) (**Figure B-24**).

Enfin, l'activité de la protéase RD21 semble être augmentée durant la sénescence foliaire naturelle chez *A. thaliana* et cela a été confirmé par une augmentation de l'abondance de la

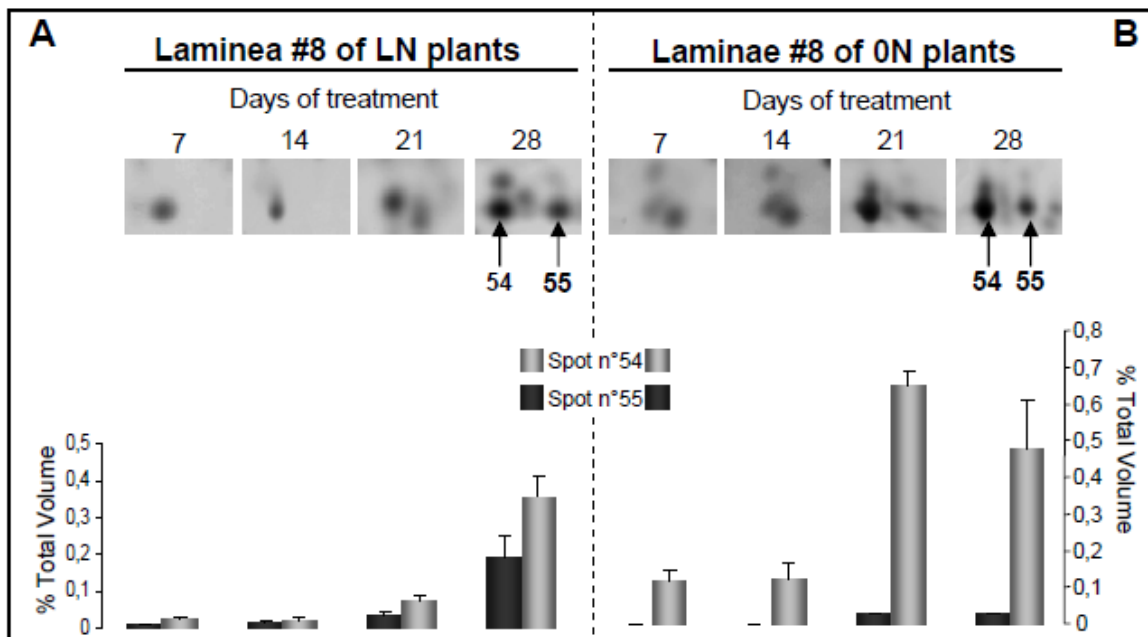


Figure B-24: Quantification de la protéine SAG12-1 d'une feuille sénescente (rang 8) de colza cultivé sous limitation (A) ou en absence de N (B). La quantification des spots 54 et 55 par le logiciel ProXpress a été déterminée en normalisant leurs volumes par rapport au volume total des spots de l'ensemble des protéines présentes sur le gel. Les spots 54 et 55 sur le gel bidimensionnel sont induits par la limitation et la privation en N en fin de sénescence, et correspondent à la protéase à cystéine SAG12-1 (Desclos *et al.*, 2009).

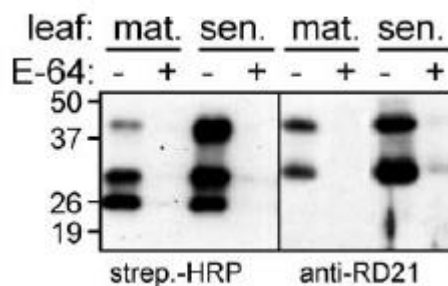


Figure B-25: Activité totale des CPs et activité de la protéine RD21 dans les feuilles matures ou sénescents d'*Arabidopsis thaliana*. Les protéases de feuilles matures ou sénescents d'*Arabidopsis thaliana* ont été biotinylées grâce au marquage avec la sonde DCG04 (spécifique des PLCPs), purifiées et analysées par immunodétection à l'aide des anticorps streptavidin-HRP et anti-RD21. (van der Hoorn *et al.*, 2004).

protéine dans les feuilles sénescents ([van der Hoorn et al., 2004](#)) (**Figure B-25**). De plus, une étude récente a mis en évidence que la protéolyse efficace observée durant la sénescence foliaire chez certains génotypes de colza au stade rosette, est associée à une forte activité des PLCPs particulièrement chez des plantes cultivées sous limitation azotée ([Girondé et al., 2016](#)).

B.IV.2.b.2 Les «vacuolar processing enzymes» (VPEs) et les métacaspases (MCs)

Les VPEs aussi appelées « legumains » appartiennent à la famille C13 dans la base de données MEROPS ([Rawling et al., 2016](#)). Ces protéases présentent une activité de type caspase 1-like ([Bonneau et al., 2008](#)).

Au niveau transcriptionnel, l'augmentation de l'expression des deux gènes α VPE et γ VPE a été observée lors de la sénescence foliaire d'*A. thaliana* ([Sanmartín et al., 2005](#)). Ces protéases sont connues pour participer à la maturation des protéases vacuolaires ([Rojo et al., 2003, 2004](#) ; [Hara-Nishimura et Hatsugai, 2011](#) ; [Roberts et al., 2012](#)). En effet, un rôle d'activateur de protéases impliquées dans le recyclage des acides aminés a été attribué à la protéase γ VPE ([Rojo et al., 2003](#)). Ces protéases semblent également nécessaires à la rupture de la vacuole lytique centrale ([Hatsugai et al., 2004](#)).

Les MCs appartiennent à la famille C14 dans la base de données MEROPS ([Rawling et al., 2016](#)). Au sein du génome d'*A. thaliana*, 9 métacaspases ont été identifiées ([Roberts et al., 2012](#)). Plusieurs études ont démontré le rôle des MCs lors du processus de PCD ([Watanabe et Lam, 2011](#)). Au niveau transcriptionnel, plusieurs gènes de MCs (*MC6* et *MC9*) sont induits au cours de la sénescence foliaire chez *A. thaliana* ([Breeze et al., 2011](#)).

B.IV.2.b.3 Localisation sub-cellulaire des CPs

L'activité maximale de ces protéases est observée à un pH acide ([van der Hoorn et al., 2011](#) ; [Diaz-Mendoza et al., 2016](#)). En effet, lors de la sénescence, ces protéases ont été particulièrement détectées au sein de la **vacuole lytique centrale**. Par exemple, chez le blé, l'induction de 4 CPs a été observée dans la vacuole pendant la sénescence foliaire induite par l'obscurité ([Martínez et al., 2007](#)). De même, il a été montré que la protéine RD21A est responsable de l'induction de la dégradation des protéines dans les vacuoles de feuilles sénescents d'*A. thaliana* ([Yamada et al., 2001](#) ; [Gu et al., 2012](#)). De plus, chez *A. thaliana*, les VPEs ont également été localisées au sein de la vacuole lytique ([Kinoshita et al., 1999](#)).

Par ailleurs, chez *A. thaliana* et chez le soja, les **senescence-associated vesicles (SAVs)** (cf. §B.IV.3) ont été caractérisées par une forte activité associée aux CPs et la protéase SAG12 a été observée au sein des SAVs ([Otegui et al., 2005](#)). D'autre part chez *A. thaliana*, certaines CPs telles que des RD21 et RD19 sont supposées être localisées dans le **cytoplasme** ([Guo et al., 2004](#))

Tableau B-6: Protéases à sérine (SPs) dont l'expression, l'abondance et/ou l'activité est augmentée durant la sénescence foliaire. SP: Protéase à sérine non identifiée ; Sn : Sénescence naturelle ; N : stress azoté ; M : stress mécanique ; Obs : obscurité ; ET : Ethylène ; MeJA : méthyl jasmonate.

Protéases à sérine	Gène	Protéine	Activité	Sénescence	Localisation	Organisme	Référence
Carboxy-peptidases	<i>CP-MIII</i>			M	Vacuole	<i>Hordeum vulgare</i>	Parrott <i>et al.</i> , 2007
Sub-L	<i>AtSASP</i>		AtSASP	Sn		<i>Arabidopsis thaliana</i>	Martínez <i>et al.</i> , 2015
	<i>AtSLP2</i>			MeJA		<i>Arabidopsis thaliana</i>	Golldack <i>et al.</i> , 2003
		P1	P1	N/Obs/ET/MeJA		<i>Triticum aestivum</i>	Roberts <i>et al.</i> , 2006 ; 2011
		P2	P2	N/Obs		<i>Triticum aestivum</i>	Roberts <i>et al.</i> , 2006 ; 2011
Clp	<i>ClpC1</i>			Sn/Obs	Chloroplaste	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nakabayashi <i>et al.</i> , 1999; Adam <i>et al.</i> , 2001 ; Lin et Wu, 2004
	<i>ClpP3</i>			Sn	Chloroplaste	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nakabayashi <i>et al.</i> , 1999; Adam <i>et al.</i> , 2001
	<i>ClpP5</i>			Sn	Chloroplaste	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nakabayashi <i>et al.</i> , 1999; Adam <i>et al.</i> , 2001
	<i>ClpD</i>			Obs	Chloroplaste	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Adam <i>et al.</i> , 2001 ; Lin et Wu, 2004
	<i>Clp</i>			N		<i>Triticum aestivum</i>	Ruuska <i>et al.</i> , 2008
		ClpC		Sn		<i>Pisum sativum</i>	Schiltz <i>et al.</i> , 2004
Deg	<i>Deg</i>			Sn		<i>Hordeum vulgare</i>	Jukanti <i>et al.</i> , 2008
	<i>Deg</i>			Sn		<i>Populus</i>	Andersson <i>et al.</i> , 2004
Autres			SP	Sn / N		<i>Brassica napus</i>	Girondé <i>et al.</i> , 2016

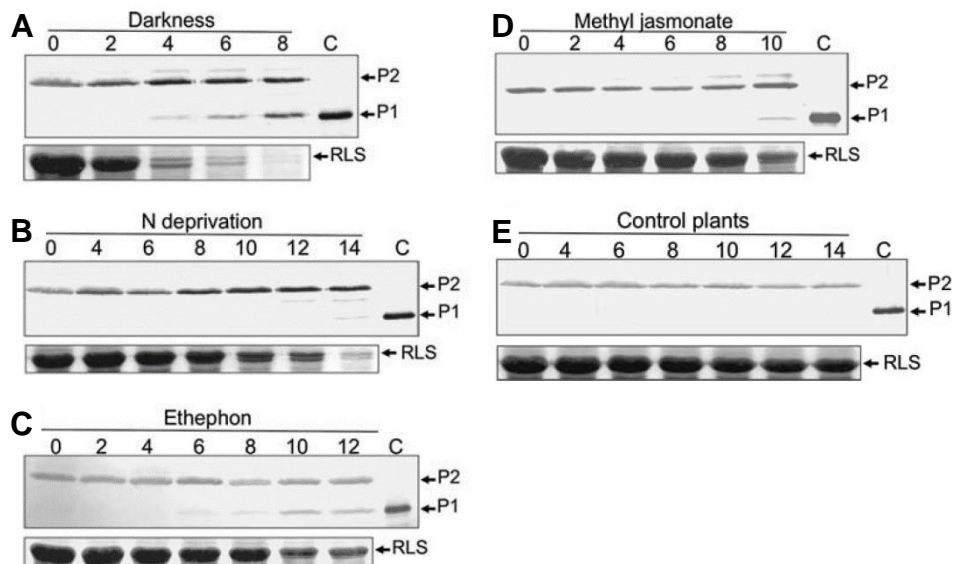


Figure B-26: Immunodétection par western-blot de Subtilisin-like (P1 et P2) au sein de feuilles de blé pendant la sénescence induite par l'obscurité (A), par une limitation en N (B), par l'application de phytohormones exogènes (Ethephon (C) ; MeJA (D)) par rapport aux plantes "contrôle" (E). Pour les illustrations C et D, les feuilles ont été soumises à une vaporisation de 1mM d'éthephon (molécule libérant de l'éthylène après décomposition) ou trempées dans 100 mM de méthyl jasmonate respectivement. La grande sous-unité de la RuBisCO est présentée en dessous de chaque graphique. La ligne C correspond à un échantillon contrôle de 0,2 µg de P1 purifiée. (D'après Roberts *et al.*, 2006).

tandis que les MCs sont principalement présentes dans le **cytoplasme** et le **noyau** (Kwon et Hwang, 2013). Bayer *et al.* (2011) ont également rapporté l'existence de CPs dans les **chloroplastes** mais aucunes ne semblent être surexprimées durant la sénescence (Carrión *et al.*, 2013). Enfin, des gènes de CPs **apoplastiques** sont surexprimées lors de la sénescence chez le tabac (Dellanoy *et al.*, 2008 ; Martínez et Guiamet, 2014).

B.IV.2.c Les protéases à sérine (SPs)

Comptant plus de 206 membres chez *A. thaliana*, les protéases à sérine correspondent à la classe de protéase la plus large chez les plantes (Tripathi et Sowdhamini, 2006 ; van der Hoorn, 2008 ; Roberts *et al.*, 2012). De nombreuses études ont démontré l'implication de ces protéases lors de la sénescence chez les plantes (**Tableau B-6**). Chez le colza au stade rosette, une étude récente sur différents génotypes à ERA contrastée a mis en évidence que la protéolyse efficace durant la sénescence foliaire était associée à une forte activité globale des SPs particulièrement en réponse à une limitation en N minéral (Girondé *et al.*, 2016).

Parmi les SPs, les sous-familles supposées avoir un rôle prépondérant pendant la sénescence correspondent aux subtilisin-like (Sub-L ; S8), aux protéases caséinolytiques (Clp ; S14), aux « degradation of periplasmic proteins » (Deg ; S1) et dans une moindre mesure aux carboxypeptidases (S10 ; voir §B.IV.2.a).

B.IV.2.c.1 Les subtilisin-like protéases (Sub-L)

Les Sub-Ls appartiennent à la famille S8 selon la base de données MEROPS (Rawling *et al.*, 2016). Cette famille compte plus de 70 membres chez *A. thaliana* (van der Hoorn, 2008). Les Sub-Ls sont synthétisées sous forme de pré-protéines inactives présentant un pro-peptide à chaque extrémité (N- et C-term) (Rautergarten *et al.*, 2005 ; van der Hoorn, 2008). De nombreuses études ont démontré le rôle des Sub-Ls lors de la sénescence (**Tableau B-6**).

Au niveau transcriptionnel, l'expression du gène *AtSASP* codant une Sub-L augmente durant la sénescence foliaire naturelle chez *A. thaliana* (Martínez *et al.*, 2015). Un traitement par application de méthyl jasmonate (MeJA), connu pour induire la sénescence, abouti à l'augmentation de l'expression du gène *AtSLP2* codant une Sub-L dans les feuilles d'*A. thaliana* (Golldack *et al.*, 2003).

Au niveau protéique, chez le blé, 2 Sub-Ls (P1 et P2) sont accumulées lors de la sénescence induite par l'obscurité, par une limitation en N minéral et par une application exogène d'ET et de MeJA (Roberts *et al.*, 2006) (**Figure B-26**).

Plusieurs activités de Sub-Ls ont été observées lors de la sénescence. En effet, l'activité de la protéase *AtSASP* chez *A. thaliana* augmente fortement lors de la sénescence foliaire naturelle

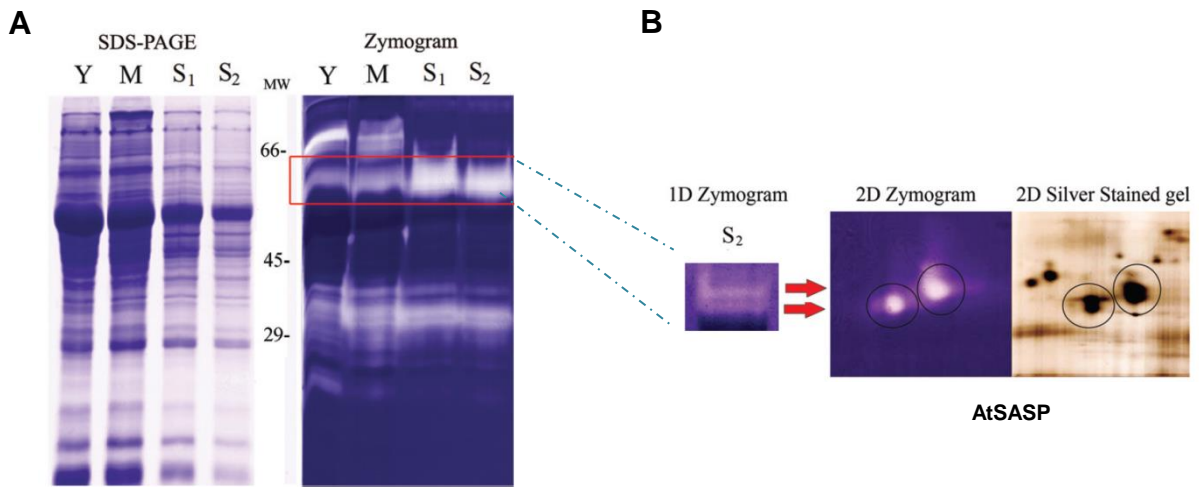


Figure B-27: Détection de l'activité protéasique de AtSASP par zymogrammes pendant la sénescence chez le blé. (A) Evolution de la quantité de protéines solubles par SDS-PAGE et de l'activité protéasique par zymogramme 1D pendant la sénescence. Y: jeunes feuilles; M: feuilles matures; S1: feuilles en début de sénescence; S2: feuilles en fin de sénescence. (B) Activités de Subtilisin-like P1 et P2 observées dans des feuilles sénescentes tardives (S2) par zymogramme 2D et colorées au nitrate d'argent. (D'après [Martínez et al., 2015](#)).

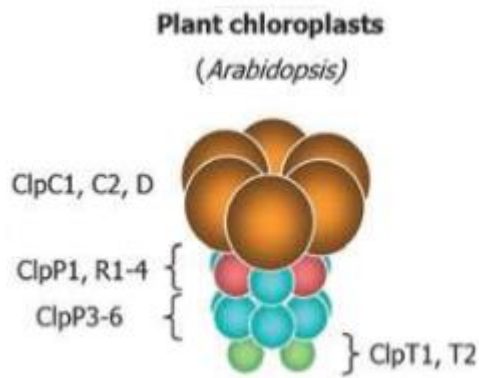


Figure B-28: Structure du complexe protéolytique Clp ATP-dépendant dans les chloroplastes d'*Arabidopsis thaliana*. (Clarke, 2012).

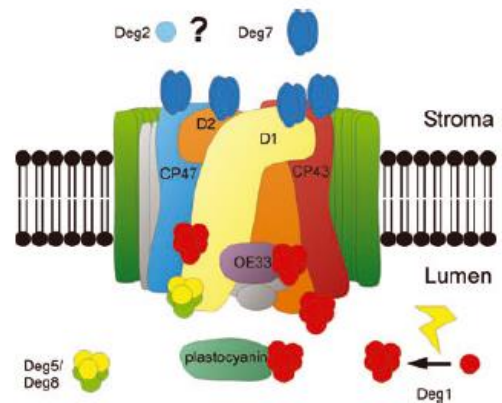


Figure B-29: Modèle présentant l'implication des Deg protéases chloroplastidiales dans la dégradation des protéines du PSII. D1 et D2 sont les protéines du centre réactionnel du PSII; CP43 (psbC) et CP47 (psbB) correspondent à des protéines de liaison à la chlorophylle a du PSII; ORE33 correspond à une sous-unité permettant la formation d'oxygène. (Schuhmann et Adamska, 2012).

(Figure B-27) (Martínez *et al.*, 2015). Chez le blé, l'accumulation protéique de P1 et P2 décrite précédemment est associée à une augmentation de l'activité de ces protéases (Roberts *et al.*, 2006). De plus, ces protéases sont supposées jouer un rôle lors de la dégradation de la RBC, dans la remobilisation du N pour le remplissage des graines ainsi que dans de processus de PCD (Roberts *et al.*, 2011).

B.IV.2.c.2 Les protéases caséinolytiques (Clp)

Les protéases caséinolytiques (Clp) appartiennent à la famille S14 selon la base de données MEROPS (Rawling *et al.*, 2016). Les Clps forment un complexe dont l'activité est dépendante d'un apport d'ATP (Olinares *et al.*, 2011 ; Clarke, 2012). Chez *A. thaliana*, la famille Clp se compose de 6 ClpP (Clp1-6) et 4 ClpP-like appelées ClpR (ClpR1-4) possédant une activité protéolytique, 2 ClpT accessoires (ClpT1-2) et 1 ClpS qui portent un rôle régulateur ainsi que 9 chaperonnes/ATPases : 3 ClpB (ClpB1, ClpB3-4), 2 ClpC (ClpC1-2), 1 ClpD et 3 ClpX (ClpX1-3) (Clarke *et al.*, 2012 ; Roberts *et al.*, 2012). Le complexe Clp chloroplastidial (325–350-kDa) est constitué d'un centre protéolytique et d'une partie chaperonne ATP-dépendante nécessaire à la reconnaissance, au dépliage et à la translocation des substrats dans le compartiment protéolytique (Olinares *et al.*, 2011 ; Roberts *et al.*, 2012). Le centre protéolytique se compose des sous-unités ClpP, ClpR et ClpT et les chaperonnes/ATPases correspondent aux Clp C1, C2 et D tandis qu'une sous-unité ClpS peut se fixer pour réguler le complexe protéolytique (Adams *et al.*, 2006 ; Clarke, 2012, Roberts *et al.*, 2012) **(Figure B-28)**. Ce complexe semble avoir un rôle dans la dégradation des protéines anormales ou mal conformées dans les chloroplastes d'*A. thaliana* (Peltier *et al.*, 2001 ; Simpson *et al.*, 2003) mais également lors de la protéolyse observée au cours de la sénescence **(Tableau B-6)**.

En effet, au niveau transcriptionnel, une augmentation de l'expression des gènes des sous-unités ClpC1, ClpP3 et ClpP5 est observée lors de la sénescence foliaire naturelle chez *A. thaliana* (Nakabayashi *et al.*, 1999). Lors d'une sénescence induite par l'obscurité chez *A. thaliana*, l'expression des gènes codant les sous-unités ClpC1 et ClpD est également augmentée (Lin *et al.*, 2004). De plus, l'expression d'un gène codant une Clp est augmentée chez le blé lors de la sénescence induite par une limitation en N (Ruuska *et al.*, 2008).

Au niveau traductionnel, une étude du protéome foliaire chez le pois a été démontré que l'abondance de la protéine ClpC augmente lors de la sénescence (Schiltz *et al.*, 2004). Même si aucune activité protéasique des Clps n'a encore été démontrée lors de la sénescence, le rôle du complexe dans la dégradation des protéines chloroplastidiales est fortement suspecté (Roberts *et al.*, 2012).

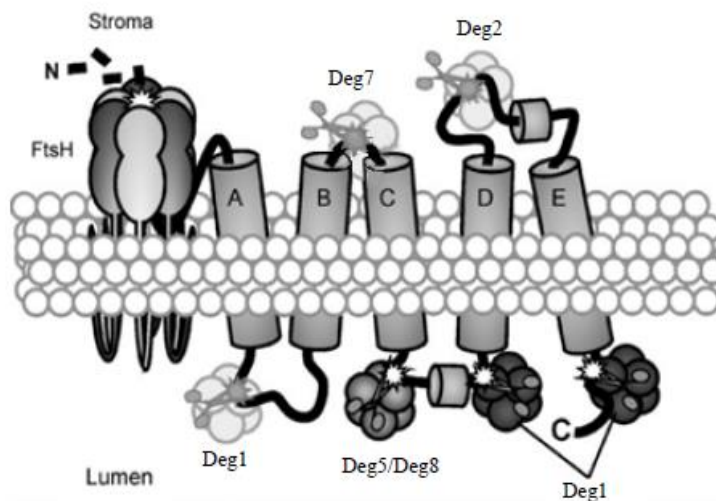


Figure B-30: Modèle présentant l'implication des Deg protéases dans la dégradation de la protéine D1 du PSII. Les domaines transmembranaires (A à E) et les extrémités de la protéine D1 sont indiqués. La protéine D1 est clivée côté lumen par les protéases Deg1 et le complexe Deg5/Deg8. Le côté stroma de D1 est dégradé par les protéases Deg2 et Deg7. Enfin les fragments de D1 sont complètement dégradés par les métalloprotéases FtsH. (Adapté de [Kato et Sakamoto, 2009](#); [Sun et al., 2010a](#)).

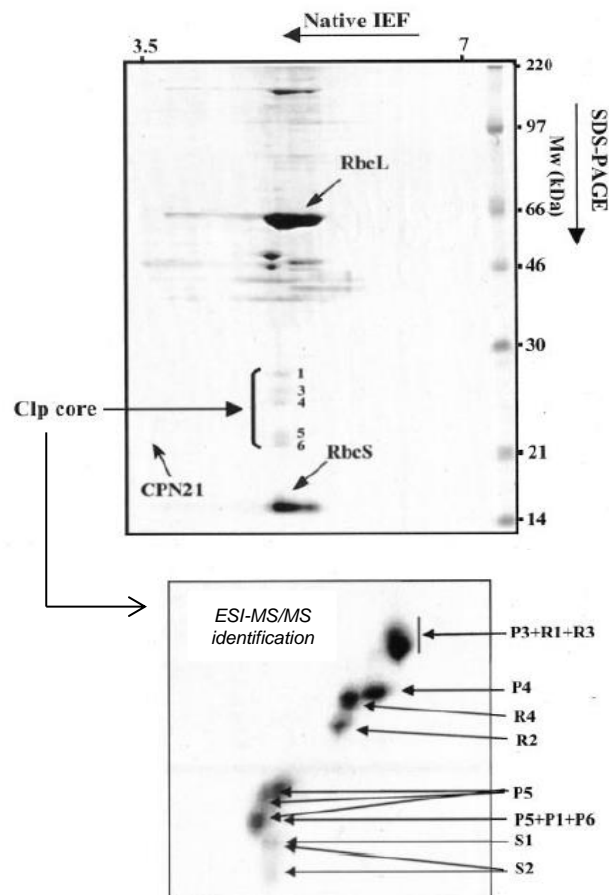


Figure B-31: Séparation des Clp protéases chloroplastiales par électrophorèse 2-D (IEF native et SDS-PAGE) et identification par ESI-MS/MS chez *Arabidopsis thaliana*. RbcL: grande sous-unité de la RuBisCO. RbcS: petite sous-unité de la RuBisCO (D'après [Peltier et al., 2004](#)).

B.IV.2.c.3 Les « *degradation of periplasmic proteins* » (Deg)

D'après la base de données MEROPS, les Deg protéases appartiennent à la famille S1 (Rawling *et al.*, 2016). Au nombre de 16 chez *A. thaliana* (Deg1-16), ces protéases ont un fonctionnement indépendant de l'ATP (Schuhmann et Adamska, 2012).

Ces protéases sont principalement étudiées pour leur implication dans la dégradation du PSII lors de forts éclaircissements (Schuhmann et Adamska, 2012). En effet, plusieurs études ont rapporté l'implication des Deg protéases dans la dégradation de nombreuses sous-unités du PSII (**Figure B-29**) mais plus particulièrement dans la dégradation de la protéine D1 (Kato et Sakamoto, 2009) en amont de l'action des métalloprotéases de type FtsH (Wagner *et al.*, 2012). Le modèle proposé pour la dégradation de la protéine D1 par les Deg protéases est présenté sur la **Figure B-30** (Kato et Sakamoto, 2009 ; Sun *et al.*, 2010a). Du fait de leur implication dans la dégradation des protéines du PSII et notamment de la protéine D1, l'implication des Deg lors de la sénescence est fortement suspectée (Roberts *et al.*, 2012) (**Tableau B-6**).

En effet, au niveau transcriptionnel, l'expression d'un gène codant une Deg est augmentée durant la sénescence foliaire naturelle chez l'orge (Jukanti *et al.*, 2008) et le peuplier (Andersson *et al.*, 2004). De plus, Luciński *et al.* (2011a-b) ont observé un retard de l'entrée en sénescence des chloroplastes chez des mutants d'*A. thaliana* n'exprimant plus *Deg2* ou *Deg5*. Au contraire, Lin et Wu (2004) ont observé une diminution de l'expression des gènes *Deg 1, 2 5 et 8* lors de la sénescence foliaire induite par l'obscurité chez *A. thaliana*. Par conséquent, le rôle de ces protéases lors de la sénescence reste à élucider.

B.IV.2.c.4 Localisation sub-cellulaire des SPs

Les SPs sont retrouvées dans de nombreux compartiments cellulaires (**Figure B-23**) (Diaz-Mendoza *et al.*, 2016).

De nombreuses études ont démontré la présence de SPs au sein des **vacuoles**. En effet, des serine carboxypeptidases ont été identifiées au sein des vacuoles lors de la sénescence foliaire naturelle ou induite mécaniquement chez le blé (Parrott *et al.*, 2007 ; Jukanti et Fisher, 2008). Bien que souvent **extra-cellulaires** (Schaller *et al.*, 2012), les Sub-Ls sont aussi présentes au sein des vacuoles de feuilles sénescentes chez *A. thaliana* (Carter *et al.*, 2004).

De nombreuses SPs ont également été identifiées au sein des **chloroplastes**. En effet, les Clps sont majoritairement retrouvées au niveau du **stroma** des chloroplastes chez *A. thaliana* (**Figure B-31**) (Adam *et al.*, 2001 ; Peltier *et al.*, 2004 ; Robert *et al.*, 2012 ; Diaz-Mendoza *et al.*, 2016) ainsi que *Deg1, 5 et 8* (Adam *et al.*, 2001 ; Schuhmann et Adamska, 2012). De plus, les protéases *Deg2 et 7* sont retrouvées dans le **lumen** des thylakoïdes (Adam *et al.*, 2001 ; Schuhmann et Adamska, 2012).

Tableau B-7: Protéases à aspartate (APs) dont l'expression, l'abondance et/ou l'activité est augmentée durant la sénescence foliaire. AP: Protéase à aspartate non identifiée ; Sn : Sénescence naturelle ; N : stress azoté ; M : stress mécanique ; ET : Ethylène ; MeJA : méthyl jasmonate ; KO : Knock out ; surexp : surexprimeur.

Protéases à aspartate	Gène	Protéine	Activité	Sénescence	Localisation	Organisme	Référence
Phytopsines	<i>phytepsine</i>			Sn		<i>Triticum aestivum</i>	Gregersen et Holm, 2007
	<i>phytepsine</i>			MeJA / M		<i>Solanum lycopersicum</i>	Beers et al., 2000
	<i>CND41-like</i>			M	Chloroplastes	<i>Triticum aestivum</i>	Parrott et al., 2007
	<i>CND41-like</i>			Sn	Chloroplastes	<i>Hordeum vulgare</i>	Jukanti et Fisher, 2008
		CND41-like		Sn	Chloroplastes	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Diaz et al., 2008
		CND41		Sn	Chloroplastes	<i>Nicotiana tabacum</i>	Kato et al., 2004
		CND41 (KO ou surexp)		Sn	Chloroplastes	<i>Nicotiana tabacum</i>	Kato et al., 2004 ; 2005
Autres	<i>LSC760</i>			Sn		<i>Brassica napus</i>	Buchanan-Wollaston et Ainsworth, 1997
	<i>AP</i>			Sn		<i>Arabidopsis thaliana</i>	Guo et al., 2004 ; Buchanan-Wollaston et al., 2005
	<i>AP</i>			Sn		<i>Oriza sativa</i>	Liu et al., 2008
		AP (gi 1326165)	AP (gi 1326165)	N		<i>Brassica napus</i>	Desclos et al., 2009 ; Girondé et al., 2016
			AP	M		<i>Brassica oleracea</i>	Wang et al., 2004
		SPAP1-fusion	SPAP1	ET		<i>Ipomoea batatas</i>	Chen et al., 2015

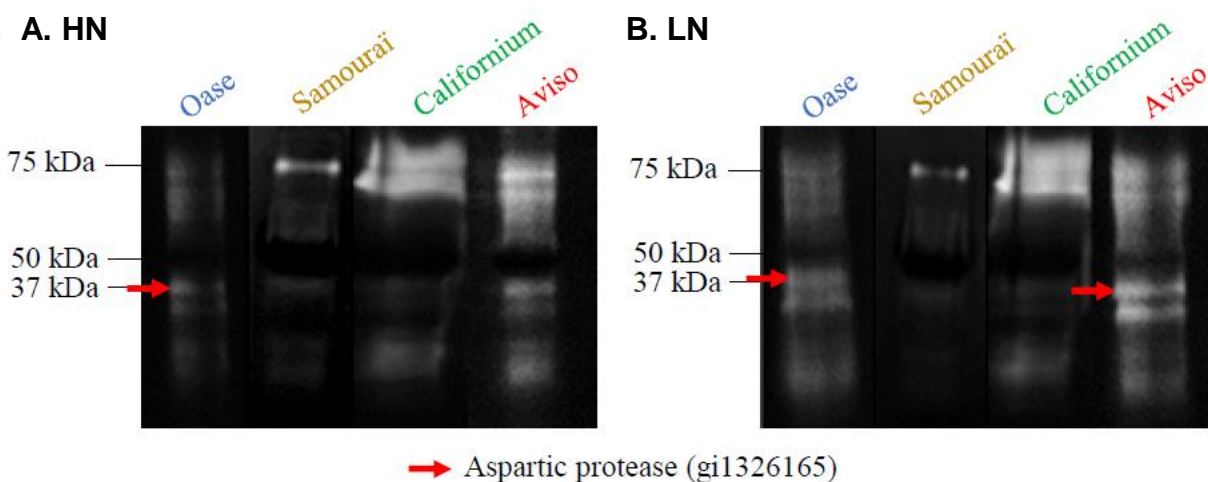


Figure B-32: Mise en évidence de l'activité d'une protéase à aspartate (AP) par zymogrammes à pH 5 au sein de feuilles sénescentes de 4 génotypes de colza soumis ou non à une limitation en N pendant 14 jours. HN: traitement fort N ; LN: traitement faible N. La protéase identifiée est présentée par une flèche rouge. (D'après Girondé et al., 2016).

Plusieurs SPs sont présentes dans la **mitochondrie**. En effet, ClpP2, ClpX1-2 (Adam *et al.*, 2001), Deg3, 4, 6, 10, 11, 12 et Deg14 (Schuhmann et Adamska, 2012) correspondent à des protéases mitochondriales chez *A. thaliana*.

Enfin, chez *A. thaliana*, Deg15 est retrouvée dans le **peroxysome**, Deg9 dans le **noyau**, Deg13 dans le **réticulum endoplasmique** et dans la **membrane plasmique** tandis que Deg7 est également retrouvée dans le **cytoplasme** (Adam *et al.*, 2001 ; Schuhmann et Adamska, 2012).

B.IV.2.d Les protéases à aspartate (APs)

Avec 158 gènes identifiés chez *A. thaliana*, les protéases à aspartate correspondent à la seconde classe de protéase la plus large chez les plantes après les SPs (Schaller, 2004 ; van der Hoorn, 2008; Roberts *et al.*, 2012). Plusieurs études ont démontré l'implication de ces protéases dans les processus de sénescence avec un rôle prépondérant associé aux phytepsines (A1, Rawling *et al.*, 2016) (**Tableau B-7**).

En effet, au niveau transcriptionnel, une induction de gènes codant des APs a été observée lors de la sénescence naturelle chez le colza (*LSC760* ; Buchanan-Wollaston et Ainsworth, 1997), *A. thaliana* (Guo *et al.*, 2004 ; Buchnan-Wollaston *et al.*, 2005), le blé (phytepsine, Gregersen et Holm, 2007) ou le riz (Liu *et al.*, 2008). Par ailleurs, chez la tomate, un gène codant une phytepsine est surexprimé lors de la sénescence induite par une application de MeJA ou une blessure (Beers *et al.*, 2000).

Au niveau protéomique, une AP (gi|1326165) est accumulée et maintenue à un niveau élevé pendant la sénescence foliaire chez le colza subissant une limitation ou privation en N minéral (Desclos *et al.*, 2009), et cette protéase est retrouvée en quantité élevée dans les feuilles chutées (Desclos-Théveniau *et al.*, 2014).

Enfin l'activité de plusieurs APs a déjà été démontrée durant la sénescence. En effet, une augmentation de l'activité de la protéase AP (gi|1326165) a été observée sur zymogrammes chez deux génotypes de colza (cv. Aviso ; cv. Oase) durant la sénescence foliaire au stade rosette induite par une limitation en N (**Figure B-32**) (Girondé *et al.*, 2016). Cette protéase semble associée à une dégradation des protéines solubles et une remobilisation efficace du N chez ces génotypes. De plus, l'activité d'une AP a été identifiée lors de la sénescence induite par une blessure chez les fleurs de brocoli (Wang *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'application exogène de la protéine de fusion SPAP1 (AP) de patate douce a permis de mettre en évidence l'implication de SPAP1 dans la sénescence induite par l'éthéphon (molécule de synthèse qui libère de l'éthylène lors de sa décomposition) (Chen *et al.*, 2015).

Parmi les APs, plusieurs études se sont focalisées sur la protéase CND41 « Chloroplast Nucleoid DNA binding protein 41 » identifiée chez le tabac (Nakano *et al.*, 1997 ; Kato *et al.*, 2004 ; 2005). Au niveau transcriptionnel, l'expression d'une CND41-like protéase a été

Tableau B-8: Métalloprotéases dont l'expression, l'abondance et/ou l'activité est augmentée durant la sénescence foliaire. MP: métalloprotéase non identifiée ; Sn : Sénescence naturelle ; N : stress azoté ; M : stress mécanique ; MeJA : méthyl jasmonate ; Obs: obscurité ; KO : Knock out ; EC: Extracellulaire.

Métalloprotéases	Gène	Protéine	Activité	Sénescence	Localisation	Organisme	Référence
	<i>FtsH</i>			Sn		<i>Arabidopsis thaliana</i>	Guo <i>et al.</i> , 2004
	<i>FtsH</i>			Sn		<i>Triticum aestivum</i>	Gregersen et Holm, 2007
	<i>FtsH</i>			Sn		<i>Populus</i>	Andersson <i>et al.</i> , 2004
		FtsH		Sn		<i>Pisum sativum</i>	Schiltz <i>et al.</i> , 2004
FtsH		FtsH2		MeJA	Chloroplastes	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Chen <i>et al.</i> , 2011
		FtsH5		MeJA	Chloroplastes	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Chen <i>et al.</i> , 2011
		FtsH8		MeJA	Chloroplastes	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Chen <i>et al.</i> , 2011
		FtsH		N		<i>Brassica napus</i>	Desclos <i>et al.</i> , 2009
		FtsH8		N		<i>Brassica napus</i>	Desclos <i>et al.</i> , 2009
			FtsH6	Obs	Chloroplastes	<i>Hordeum vulgare</i>	Zelisko et Jackowski, 2004
			FtsH6 (KO)	Obs	Chloroplastes	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Zelisko <i>et al.</i> , 2005
MPP	β -MPP			Sn		<i>Pisum sativum</i>	Schiltz <i>et al.</i> , 2004
		α -MPP		Sn / N		<i>Brassica napus</i>	Desclos <i>et al.</i> , 2009
		β -MPP		Sn / N		<i>Brassica napus</i>	Desclos <i>et al.</i> , 2009
MMP	<i>At1-MMP</i>			Sn	EC	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Flinn, 2008
	<i>At2-MMP</i>			Sn	EC	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gollmack <i>et al.</i> , 2002
	<i>At3-MMP</i>			Sn	EC	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Flinn, 2008
	<i>At4-MMP</i>			Sn	EC	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Flinn, 2008
	<i>At5-MMP</i>			Sn	EC	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Flinn, 2008
	<i>SMEP1</i>			Sn	EC	<i>Glycine max</i>	Graham <i>et al.</i> , 1991 ; Pak <i>et al.</i> , 1997
	<i>Cs1-MMP</i>			Sn	EC	<i>Cucumis sativus</i>	Delorme <i>et al.</i> , 2000
Autres	MP			Sn		<i>Hordeum vulgare</i>	Jukanti <i>et al.</i> , 2008
	MP			M		<i>Hordeum vulgare</i>	Parrott <i>et al.</i> , 2007
		MP		Sn		<i>Triticum aestivum</i>	Chauhan <i>et al.</i> , 2009
		MP		M		<i>Brassica oleracea</i>	Coupe <i>et al.</i> , 2003
			MP	N		<i>Brassica napus</i>	Girondé <i>et al.</i> , 2016

augmentée lors de la sénescence induite par une blessure chez le blé (Parrott *et al.*, 2007) et lors de la sénescence après anthèse chez l'orge (Jukanti et Fisher, 2008). Chez le tabac, la protéase CND41 est capable de dégrader *in vitro* la RBC à pH physiologique 7,5 (Kato *et al.*, 2004). De plus, un mutant de tabac n'exprimant plus CND41 présente un retard de sénescence en cas de limitation en N associé à un défaut de remobilisation du N (Kato *et al.*, 2005) tandis que des mutants de tabac surexprimant CND41 présentent une sénescence précoce (Kato *et al.*, 2001 ; 2004 ; 2005). Enfin, chez *A. thaliana*, l'induction de 2 CND41 putatives est associée à une diminution de la quantité de RBC et corrélée avec la progression de la sénescence dans des lignées hybrides présentant des niveaux de sénescence différents (Diaz *et al.*, 2008).

Enfin, les APs peuvent être présentes dans différents compartiments cellulaires. En effet, CND41 a clairement été identifiée dans les **chloroplastes** (Kato *et al.*, 2004 ; 2005 ; Kato et Sakamoto, 2010). Par ailleurs, les phytepsines sont principalement **vacuolaires** mais peuvent être retrouvées dans le milieu **extracellulaire**, associées à des activités protéolytiques lors des phénomènes de PCD (Vieira *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2015).

B.IV.2.e Les métalloprotéases (MPs)

Les métalloprotéases sont des protéases qui présentent un cation métallique, en général un atome de zinc, au niveau de leur site catalytique. Le génome d'*A. thaliana* présente 81 gènes codant des MPs (Schaller, 2004) et de nombreuses études ont permis de mettre en évidence l'implication de ces protéases lors des processus de sénescence (**Tableau B-8**).

Parmi les MPs, les familles qui semblent avoir un rôle prépondérant lors de la sénescence correspondent aux « Filamentation temperature-sensitive H » (FtsH, M41), aux « Mitochondrial processing-peptidases » (MPPs; M16) et aux « Matrix metalloproteinases » (MMPs, M10).

B.IV.2.e.1 Les « Filamentation temperature-sensitive H » (FtsH)

Les FtsH sont des MPs trans-membranaires possédant un site de liaison au zinc au sein de leur site catalytique et dont le fonctionnement est ATP-dépendant (Wagner *et al.*, 2012). Le génome d'*A. thaliana* présente 17 gènes de FtsH dont seulement 12 codent pour des formes actives (Garcia-Lorenzo *et al.*, 2006). Une association en hexamère de plusieurs isoformes de FtsH par paire est nécessaire à leur fonctionnement (Adam *et al.*, 2006). Les protéases FtsH jouent un rôle dans divers processus chez la plante mais le rôle le plus connu correspond à la dégradation de la protéine D1 du PSII en association avec les Deg protéases (Kato et Sakamoto, 2009 ; Nixon *et al.*, 2010 ; Wagner *et al.*, 2012 ; **Figure B-30**). Par ailleurs, leur implication dans les processus de sénescence a été démontrée à différents niveaux (**Tableau B-8**).

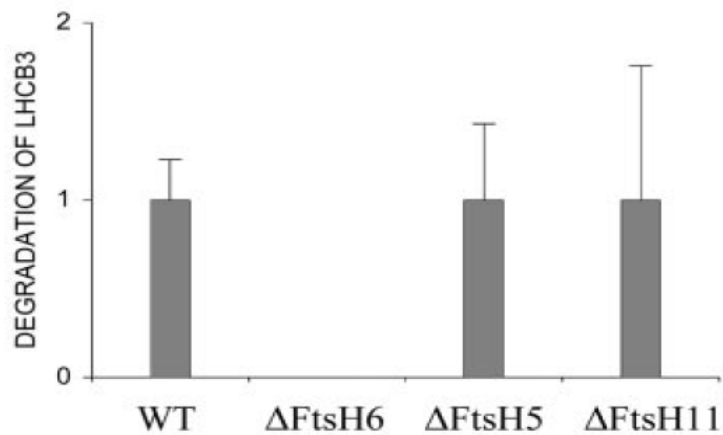


Figure B-33: Dégradation *in vivo* de lhcb3 chez la plante sauvage d'*Arabidopsis thaliana* (WT) et des mutants KO de FtsH6, 5 et 11. La dégradation *in vivo* de lhcb3 dans la membrane de thylakoïdes isolés à partir de feuilles sénescents est observée après 6h d'incubation. La dégradation de lhcb3 est seulement inhibée chez le mutant *FtsH6* (Zelisko *et al.*, 2005).

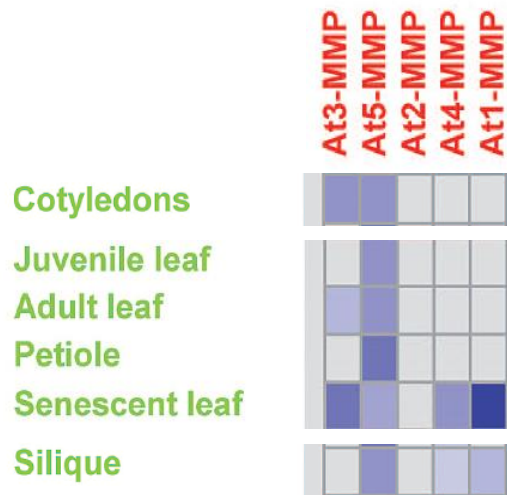


Figure B-34: Expression des «matrix metalloproteinases» (MMP) d'*Arabidopsis thaliana* dans les cotylédons, les feuilles d'âges différents au sein de la rosette et dans les siliques. La couleur bleue indique le niveau d'expression avec un bleu plus foncé représentant une expression plus forte. L'expression de tous les gènes codant les MMP d'*Arabidopsis* augmentent dans la feuille sénescents, sauf *At2-MMP* et *At5-MMP*. (D'après Flinn, 2008).

En effet, au niveau transcriptionnel, des gènes codant des FtsH sont induits lors de la sénescence foliaire naturelle chez *A. thaliana* (Guo *et al.*, 2004), le blé (Gregersen et Holm, 2007) et le peuplier (Andersson *et al.*, 2004).

Au niveau traductionnel, une FtsH est accumulée lors de la sénescence foliaire naturelle chez le pois et semble associée à la remobilisation du N (Schiltz *et al.*, 2004). L'application exogène de MeJA, provoquant la sénescence, induit l'accumulation des protéases FtsH 2, 5 et 8 au sein des feuilles d'*A. thaliana* (Chen *et al.*, 2011). Enfin, chez le colza, une limitation/privation en N provoque l'accumulation de 2 protéases FtsH dont FtsH8 lors de la sénescence foliaire (Desclos *et al.*, 2009).

L'implication des FtsH, particulièrement FtsH6, a également été démontrée dans la dégradation des protéines du PSII telles que Lhcb3 (apoprotéine majeur du LHCI du PSII) chez l'orge (Zelisko et Jackowski, 2004) et grâce à des mutants *FtsH6* d'*A. thaliana* (Zelisko *et al.*, 2005 ; **Figure B-33**) lors de la sénescence foliaire induite par l'obscurité.

B.IV.2.e.2 Les « Mitochondrial processing-peptidases » (MPPs)

Les MPPs se composent de 2 sous-unités distinctes : la sous-unité catalytique β -MPP portant l'activité protéolytique et le site de liaison au zinc et la sous-unité α -MPP responsable de la spécificité du substrat (Braun et Schmitz, 1997). Chez *A. thaliana*, il existe 2 α -MPP et une β -MPP. Ces protéases sont connues pour avoir un rôle dans la maturation des protéines en clivant la pré-séquence des protéines importées dans les mitochondries (Gakh *et al.*, 2002). Ainsi l'induction de ces protéases pendant la sénescence pourrait augmenter ce processus d'importation et ainsi maintenir la production d'énergie par les mitochondries (Quirino *et al.*, 2000). En comparaison aux FtsH, ces protéases sont peu décrites mais quelques études ont néanmoins démontré leur implication dans les processus de sénescence (**Tableau B-8**).

En effet, au niveau transcriptionnel, une augmentation de l'expression d'un gène codant une β -MPP a été constatée lors de la sénescence naturelle chez le pois et a été associée à la remobilisation du N (Schiltz *et al.*, 2004).

Une étude protéomique sur la feuille de colza a également révélé que le niveau d'abondance de la protéine α -MPP suivie par celle de β -MPP augmentait fortement lors de la sénescence foliaire induite ou non par une limitation en N (Desclos *et al.*, 2009).

B.IV.2.e.3 Les « Matrix metalloprotéinases » (MMPs)

Les MMP sont des protéases dont l'activité, à pH alcalin, est dépendante du zinc et du calcium. Dans le génome d'*A. thaliana*, 5 gènes codants pour des MMPs ont été identifiées (*At1-MMP* à

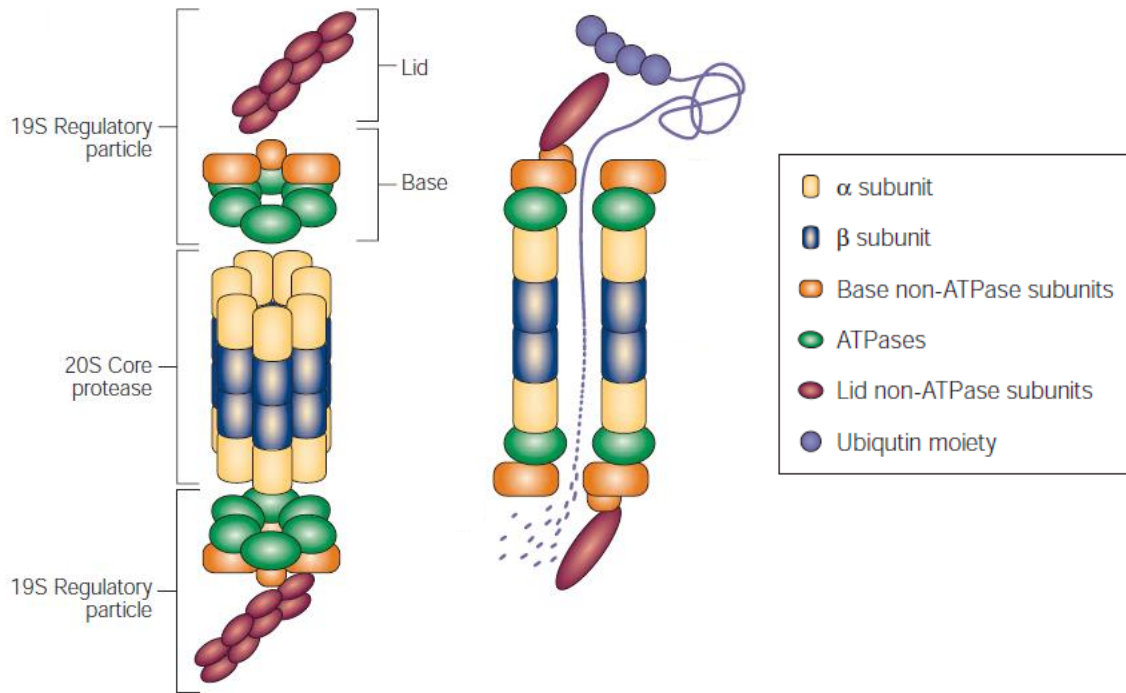


Figure B-35: Présentation de la structure et du fonctionnement théorique du protéasome 26S. Le 26S est composé d'une partie protéolytique 20S et de une partie régulatrice 19S. Les protéines portant un résidu ubiquitine sont reconnues par la partie 19S qui permet également l'inclusion du substrat au sein du 20S. Les protéines sont ensuite dégradées par les sous-unités protéolytiques $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$ du 20S. Les peptides et acides aminés formés sont relâchés ensuite hors du 26S. (Sullivan *et al.*, 2003).

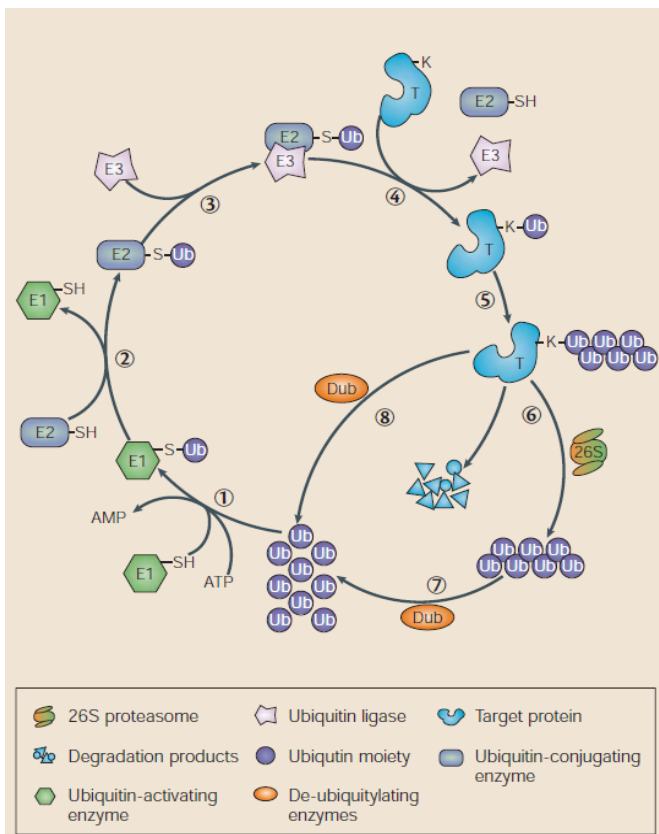
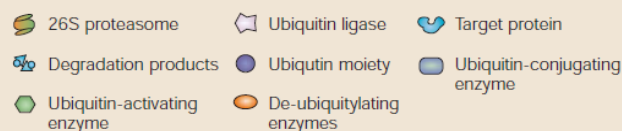


Figure B-36: Ubiquitination des protéines par les enzymes E1-3 en amont de l'activité du protéasome 26S.

(1) E1 utilise de l'ATP pour activer le résidu Ub et le fixer, (2) l'Ub activée est transférée sur E2, (3) E2-Ub se fixe à E3, (4) le résidu Ub est transféré sur le substrat protéique, (5) le processus précédent peut se répéter plusieurs fois afin de former une chaîne de résidu Ub, (6) la protéine ubiquitinisée va être reconnue et dégradée par le 26S en relâchant des peptides/acides aminés et la chaîne de résidu Ub. Enfin, des enzymes permettent de séparer les différents résidu Ub de la chaîne après (7) ou avant (processus réversible) (8) la dégradation de la protéine par le 26S. (Sullivan *et al.*, 2003).



At5-MMP) (Marino *et al.*, 2014). L'implication de ces protéases a également été démontrée lors de la sénescence (**Tableau B-8**).

Des analyses transcriptionnelles par microarray ont démontré que les gènes des MMPs sont fortement exprimés lors de la sénescence chez *A. thaliana* (**Figure B-34**) (Flinn, 2008). De plus, l'expression du gène *Cs1-MMP* chez le concombre, *SMEP1* chez le soja et *At2-MMP* chez *A. thaliana* est induite lors de la sénescence naturelle (Graham *et al.*, 1991 ; Pak *et al.*, 1997 ; Delorme *et al.*, 2000 ; Gollmack *et al.*, 2002).

B.IV.2.e.4 Localisation subcellulaire des métalloprotéases

De par leurs rôles dans divers processus, les MPs sont présentes dans différents compartiments cellulaires. En effet, les protéases FtsH 1, 2, 5-9, 11 et 12 ont été identifiées au sein des **chloroplastes** (Wagner *et al.*, 2012). D'autres FtsH (FtsH 3, 4, 10 et 11 ; Wagner *et al.*, 2012) et les MPPs (Braun et Schmitz, 1997 ; Gakh *et al.*, 2002) ont été identifiées au sein des **mitochondries**. Enfin, les MMPs correspondent à des protéases présentes dans l'espace extracellulaire ainsi que dans la membrane plasmique (Marino *et al.*, 2014).

B.IV.2.f Les protéases à thréonine : le protéasome (TPs)

Le protéasome 26S est un complexe protéolytique de 700 kDa (**Figure B-35**) responsable de la dégradation spécifique de protéines anormales ou de courte vie (Sullivan *et al.*, 2003). Ce complexe est composé d'une partie catalytique 20S composées de 2 anneaux de 7 sous-unités α et de 2 anneaux de 7 sous-unités β (Sullivan *et al.*, 2003) (**Figures B-35**). Au sein de ce complexe 20S, 3 activités protéasiques ont été identifiées : chymotrypsine-like ($\beta 5$), trypsine-like ($\beta 2$) et peptidyl glutamyl-peptide hydrolase ($\beta 1$) (Smalle et Vierstra, 2004). La deuxième partie du 26S correspond à une partie régulatrice 19S, placée à chaque extrémité du 26S, composée de 17 sous-unités dont 6 ATP-ases (Sullivan *et al.*, 2003 ; Vierstra, 2003) (**Figure B-35**). Cette partie 19S est responsable de la reconnaissance, de l'insertion du substrat mais également de l'entrée du substrat au sein du 20S (Sullivan *et al.*, 2003).

Ce complexe nécessite au préalable l'ubiquitination (ajout d'un résidu ubiquitine (Ub)) réversible des protéines cibles (Smalle et Vierstra, 2004). Cet ajout est réalisé par plusieurs enzymes : E1 (enzyme d'activation du résidu Ub), E2 (enzyme de liaison à l'Ub) et E3 (ligase). Chaque ligase E3 est responsable de la reconnaissance d'un faible nombre de substrats protéiques, c'est pourquoi un grand nombre de gènes codent des E3 chez *A. thaliana* (Smalle et Vierstra, 2004 ; Kurepa et Smalle, 2008). Le fonctionnement de ces enzymes en relation avec le protéasome 26S est présenté sur la **Figure B-36** (Sullivan *et al.*, 2003).

Tableau B-9: Sous-unités du protéasome 26S et du processus d'ubiquitination dont l'expression, l'abondance et/ou l'activité est augmentée durant la sénescence foliaire. 26S: gène non identifiée ; Sn : sénescence naturelle ; N : stress azoté ; MeJA : méthyl jasmonate ; Obs: obscurité; ET: éthylène; ABA: acide abscissique ; ssu:sous-unité ; KO : Knock out .

Protéases à thréonine	Gène	Protéine	Activité	Sénescence	Localisation	Organisme	Référence
	8 gènes 20S			Sn	Noyau / cytoplasme	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Guo et al., 2004
	gènes ssu- α			Sn	Noyau / cytoplasme	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Kurepa et Smalle, 2008
20S	gènes ssu- α			MeJA	Noyau / cytoplasme	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Chen et al., 2011
	gènes ssu- β			Sn	Noyau / cytoplasme	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Kurepa et Smalle, 2008
		$\beta 1$		N		<i>Brassica napus</i>	Desclos et al., 2009
19S	gènes du 19S			Sn	Noyau / cytoplasme	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Kurepa et Smalle, 2008
	5 gènes 26S			Sn	Noyau / cytoplasme	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Guo et al., 2004
26S total	3 gènes 26S			Obs	Noyau / cytoplasme	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Lin et Wu, 2004
			26S	N		<i>Brassica napus</i>	Girondé et al., 2016
	SEN3			Sn / MeJA / ABA / ET	Noyau / cytoplasme	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Park et al., 1998
Ubiquitination	13 gènes E1-E2			Obs	Noyau / cytoplasme	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Lin et Wu, 2004
	71 gènes E3			Obs	Noyau / cytoplasme	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Lin et Wu, 2004
			ORE9 (KO)	Sn / MeJA / ABA / ET	Noyau / cytoplasme	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Woo et al., 2001

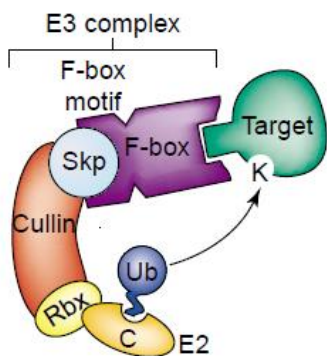


Figure B-37: Exemple d'un complexe E3 ligase: le complexe de type SCF. Le complexe E3 contient plusieurs protéines dont des protéines de la F-box. (Vierstra, 2003).

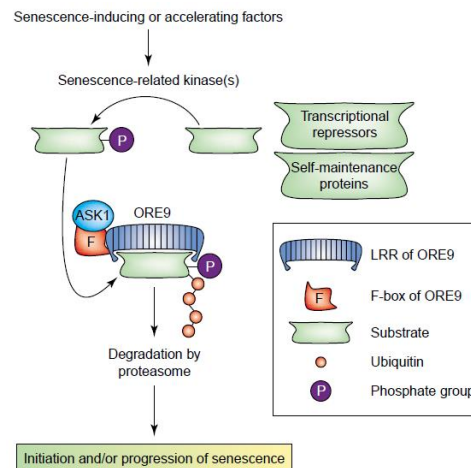


Figure B-38: Modèle hypothétique du fonctionnement de ORE9 en relation avec le protéasome pendant la sénescence foliaire chez *Arabidopsis thaliana*. (Lim et al., 2003).

Au sein du génome d'*A. thaliana* plus de 5% du génome code pour des protéines appartenant au complexe total UPS (« Ubiquitin 26S-Proteasome system ») soit plus de 1300 gènes dont 23 et 31 pour le 20S et 19S respectivement (Vierstra, 2003). L'importance du nombre de ces gènes démontre bien l'implication cruciale du protéasome dans le métabolisme de la cellule. Par ailleurs, de nombreuses études ont démontré l'implication du système UPS lors de la sénescence (**Tableau B-9**).

Au niveau transcriptionnel, de nombreux gènes de l'UPS sont surexprimés durant le processus de sénescence. Lors de la sénescence naturelle chez *A. thaliana*, 8 gènes du 20S, 5 gènes codant des ATPases du 26S sont surexprimés (Guo *et al.*, 2004) notamment plusieurs codant des sous-unités β et des sous-unités α mais également des gènes codant des protéines du 19S (Kurepa *et Smalle*, 2008). Lors de la sénescence naturelle ou induite par l'obscurité, par l'application de MeJA, d'acide abscissique et d'éthylène, le gène *SEN3* codant une polyubiquitine est induit chez *A. thaliana* (Park *et al.*, 1998). Par ailleurs, lors de la sénescence induite par l'obscurité, 13 gènes codant pour des E1/E2, 3 gènes codants pour des sous unités du 26S (RPN2, RPN11 et RPN12) et 71 gènes codant pour des complexes protéiques F-box (sous-unités du complexe ligase E3 de type SCF, **Figure B-37**) sont surexprimés chez *A. thaliana* (Lin *et Wu*, 2004). Par ailleurs, le rôle d'ORE9 a été démontré lors de la sénescence. ORE9 correspond à une protéine de la F-box du complexe ligase E3 de type SCF (**Figure B-37**). Le rôle théorique de ORE9 lors de la sénescence foliaire chez *A. thaliana* est présenté sur la **Figure B-38** (Lim *et al.*, 2003). En effet, des mutants ORE9 d'*A. thaliana* présentent un retard de l'initiation de la sénescence naturelle ou induite par le MeJA, l'ABA et l'éthylène (Woo *et al.*, 2001) (**Figure B-39**).

Grâce à une étude protéomique chez le colza, Desclos *et al.* (2009) ont démontré que la sous-unité $\beta 1$ du protéasome 20S s'accumule à la fin de la sénescence foliaire induite par une limitation/privation en N minéral. Par ailleurs, la sous-unité $\beta 1$ présente une activité caspase-like (Hara-Nishimura *et Hatsugai*, 2011). Ces activités caspase-like semblent fortement associées à la sénescence (cf. § B.IV.2.b.2) et par conséquent la sous-unité $\beta 1$ du protéasome pourrait avoir un rôle important lors de la sénescence.

Une étude récente a démontré que l'activité du protéasome est fortement impliquée dans la remobilisation du N lors de la sénescence foliaire particulièrement lors d'une limitation en N (Girondé *et al.*, 2016). Par ailleurs, plusieurs études ont postulé que le protéasome pourrait plutôt avoir un rôle prépondérant dans la régulation de la sénescence *via* un contrôle du stress oxydatif grâce à la dégradation de certaines enzymes impliquées dans la formation de ROS (Lequeu *et al.*, 2005 ; Gregersen, 2011 ; Avila-Ospina *et al.*, 2014).

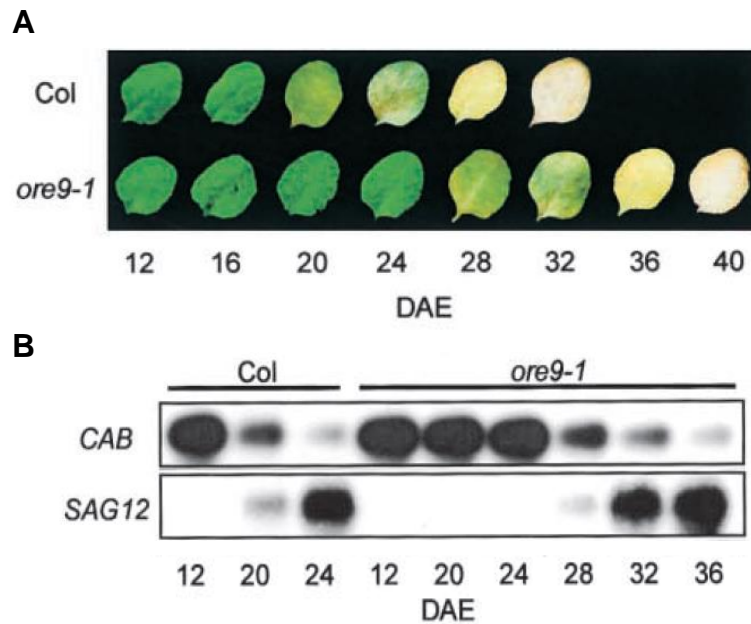


Figure B-39: Mise en évidence du retard de sénescence d'un mutant *ore9-1* par rapport aux plantes sauvages d'*Arabidopsis thaliana*. (A) Phénotypes du mutant *ore9-1* en comparaison au génotype sauvage (col) lors de la sénescence foliaire naturelle et (B) expression des gènes *SAG12* et *Cab* lors de la sénescence naturelle chez le mutant *ore9-1* en comparaison au génotype sauvage (col). DAE: jour après émergence. (D'après Woo *et al.*, 2001).

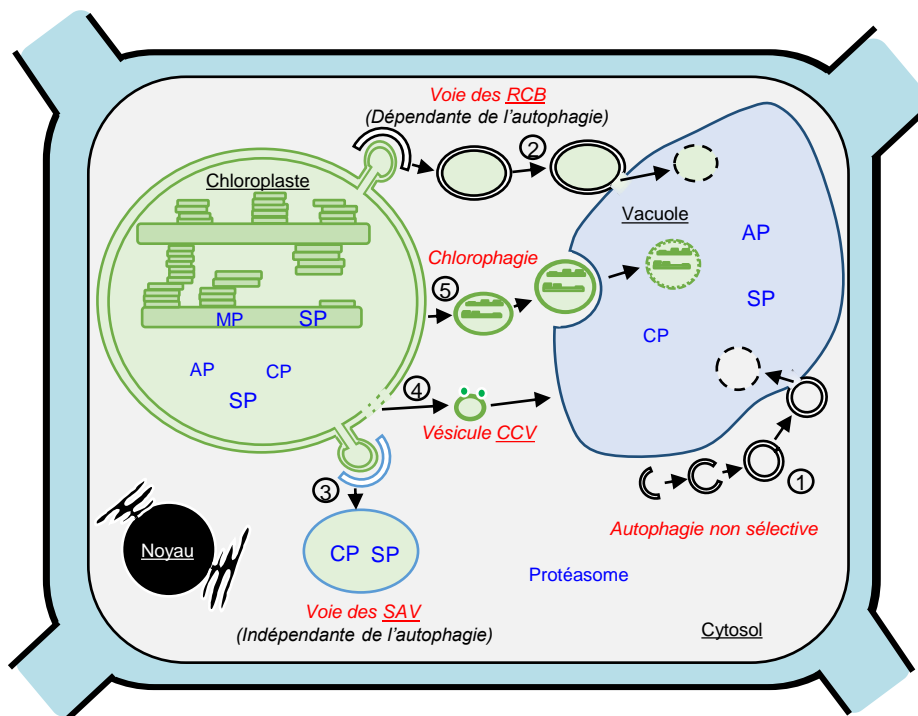


Figure B-40: Dégradation des protéines chloroplastidiales et du chloroplaste par différents processus. En plus de l'autophagie non sélective des composants et des organites cytoplasmiques (1), les chloroplastes et leurs protéines plastidiales peuvent être dégradés sélectivement par des voies impliquant les RCBs («Rubisco containing bodies») (2) ou les SAVs (« Senescence-Associated Vesicle ») (3). D'autres vésicules nommées CCVs (Chloroplast-containing vesicles) contenant des protéines chloroplastidiales seraient transportées directement vers la vacuole (4). Enfin, lorsque la dégradation du chloroplaste est avancée, la digestion de l'ensemble du chloroplaste dans la vacuole (chlorophagie (5)) est supposée. CP: cystéine protéase; SP: sérine protéase; AP: protéase à aspartate; MP: métalloprotéases. (D'après Ishida *et al.*, 2014; Wang et Blumwald, 2014; Diaz-Mendoza *et al.*, 2016).

Enfin, le protéasome 26S a été localisé dans le **cytoplasme** et dans le **noyau** (Beers *et al.*, 2000) et a pour cibles principales des protéines du cytoplasme, du noyau mais aussi de la membrane et du réticulum endoplasmique.

B.IV.3 Compartimentation protéines/protéases et trafic vésiculaire associé à la protéolyse

Il été clairement défini dans le chapitre §B.II.II.1 que les protéines chloroplastidiales sont les principales sources de N mobilisable vers les organes en croissance. Par ailleurs, comme rappelé dans le chapitre § B.II.II.2, même si ces protéines peuvent être dégradées par des protéases chloroplastidiales, leur protéolyse est essentiellement effectuée par des protéases majoritairement vacuolaires ou présentes dans d'autres compartiments cellulaires. Ces observations interrogent sur la compartimentation cellulaire des protéines dégradées pendant la sénescence et la mise en présence de celle-ci avec les protéases vacuolaires (Avice et Etienne, 2014 ; Distelfeld *et al.*, 2014). De récentes études ont démontré l'existence d'un trafic cellulaire impliquant plusieurs voies permettant de transporter ces protéines pendant la sénescence (**Figure B-40**).

En effet, le transport des protéines chloroplastidiales vers la vacuole centrale peut être réalisé par des **SAVs** « senescence-associated vesicles » à un stade précoce de sénescence (Ono *et al.*, 2013). Les SAVs correspondent à des petits compartiments vacuolaires qui coexistent avec la vacuole centrale et qui présentent une forte activité protéolytique particulièrement associée à la présence de protéases à cystéine telle que SAG12 (Otegui *et al.*, 2005 ; Martínez *et al.*, 2007 ; 2008a). La grande sous-unité de la RBC (RBCL) ainsi que la GS2 ont été identifiées dans une fraction enrichie en SAVs purifiée à partir de feuilles sénescents de tabac (Martínez *et al.*, 2008a ; Carrión *et al.*, 2013). De plus, l'inhibition *in vivo* des protéases à cystéine a complètement supprimé la dégradation de la RBCL au sein de SAVs isolées à partir de feuilles sénescents de tabac (Carrión *et al.*, 2013 ; 2014).

En supplément des SAVs, des corps autophagiques appelés **RCBs** « RuBisCO containing bodies » ont été identifiés au sein du cytoplasme de feuilles sénescents (**Figure B-40**) et sont également redirigés vers la vacuole centrale ou vers les SAVs (Chiba *et al.*, 2003 ; Martínez *et al.*, 2008a ; Prins *et al.*, 2008 ; Izumi *et al.*, 2010). Ces RCBs proviennent des stromules formés à partir de l'enveloppe plastidiale et contiennent des protéines du stroma et leurs produits de dégradation mais pas de protéines thylakoïdiennes et aucune preuve d'activité protéasique n'a encore été établie (Ishida *et al.*, 2008 ; Carrión *et al.*, 2013). Contrairement aux SAVs, la formation des RCBs est dépendante des gènes d'**autophagie** (Ishida *et al.*, 2014). L'autophagie correspond à une voie de recyclage des organites et des métabolites cytosoliques et

chloroplastidiaux vers la vacuole lytique centrale afin de réaliser leur dégradation (Ishida *et al.*, 2014). Les phénomènes d'autophagie semblent également avoir un rôle lors de la sénescence et dans la remobilisation du N. En effet, par rapport au type sauvage, des mutants d'autophagie présentent un défaut de remobilisation du N vers les graines chez *A. thaliana* (Avila-Ospina *et al.*, 2014).

Une troisième voie de dégradation des protéines chloroplastidiales a été mise en évidence récemment chez *A. thaliana* (Wang et Blumwald, 2014). En effet, d'autres vésicules nommées **CCVs** « chloroplast-containing vesicles » contenant des protéines de la membrane ou du lumen des thylakoïdes seraient transportées directement vers la vacuole centrale.

Néanmoins, il existe très peu d'informations sur la présence de ces voies au sein des feuilles de colza sénescences. Ainsi, l'identification de ces différentes vésicules pourrait permettre de comprendre les voies de dégradation des protéines chloroplastidiales dans les différents compartiments subcellulaires lors de la sénescence chez le colza et peut être d'identifier les voies de protéolyse les plus efficaces.

B.IV.4 La régulation des activités protéasiques

La protéolyse associée à la sénescence peut être régulée par différents processus à différents niveaux.

En effet, cette régulation peut être réalisée par contrôle de l'expression des gènes codant des protéases par des mécanismes de régulation transcriptionnelle. Différents facteurs de transcription sont reconnus pour avoir un rôle de régulation positive ou négative sur l'expression de protéases durant la sénescence. En effet, chez *A. thaliana*, la surexpression du facteur de transcription WRKY53 aboutit à la surexpression du gène *SAG12* (Miao *et al.*, 2004). D'autre part, les facteurs de transcription NAC du groupe 3 sont fortement co-régulés avec l'expression de plusieurs *SAGs* lors de la sénescence foliaire chez le blé et certains gènes codant des protéases à cystéine présentent, en effet, un promoteur NACBS (Christiansen et Gregersen, 2014). De plus, la surexpression d'un facteur NAC (TaNAC-S) chez le blé permet d'augmenter la concentration en N des grains associés à une sénescence foliaire retardée (Zhao *et al.*, 2014).

La régulation des protéases peut également s'effectuer de façon post-traductionnelle avec une régulation directement de l'activité protéasique par deux voies distinctes.

Par exemple, la plupart des CPs sont synthétisées sous forme inactive et nécessitent une auto-activation ou une activation *via* l'action d'autres enzymes (Diaz-Mendoza *et al.*, 2016). Cette activation se réalise grâce au clivage de leur pro-peptide (Wiederanders, 2003). Ces pro-peptides ne sont pas seulement capables d'inactiver la protéase qui les porte mais également des protéases connexes (Cambra *et al.*, 2012a). Jusqu'à présent aucune information n'a été publiée

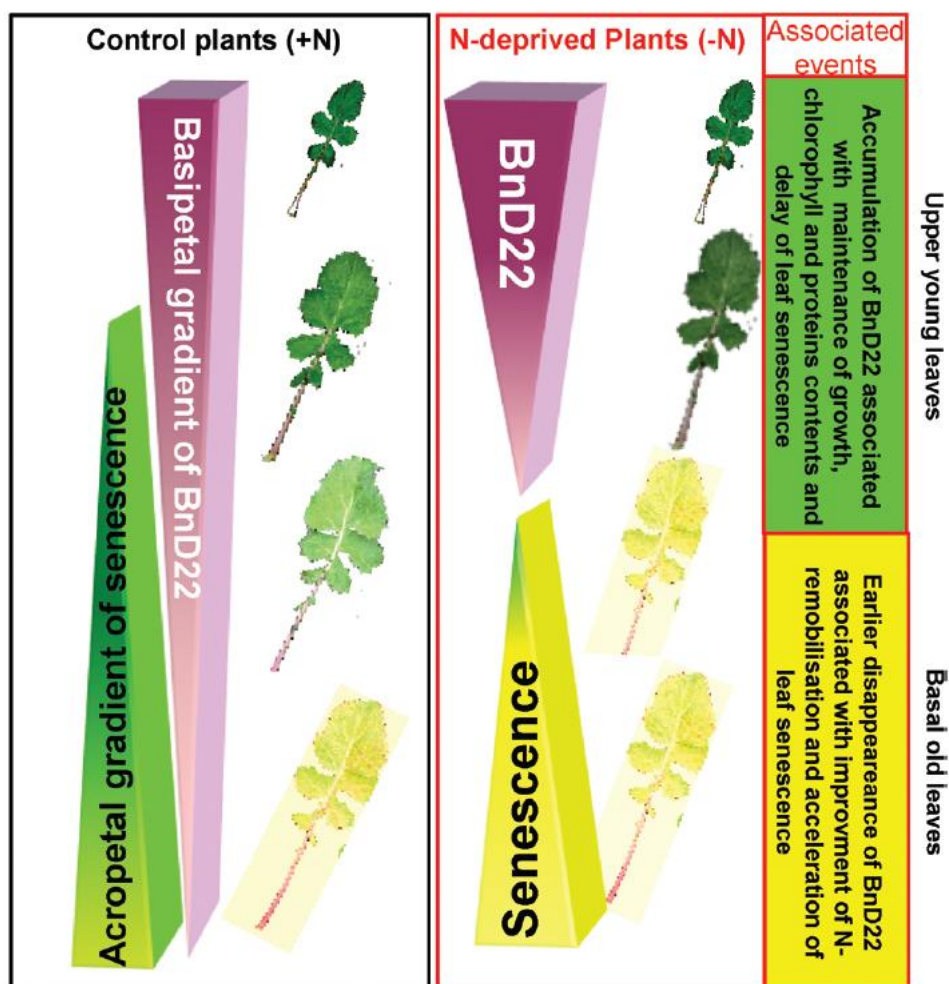


Figure B-41: Représentation schématique de la progression acropétale de la sénescence et du gradient basipétal de l'accumulation de BnD22 le long de l'axe de la plante de colza subissant ou non une limitation en N. Les événements physiologiques ayant lieu dans les jeunes feuilles ou dans les vieilles feuilles cultivées sous limitation azotée, associés au processus de sénescence et à BnD22 sont présentés dans les cadres vert et jaune respectivement. (D'après Etienne *et al.*, 2007 ; Desclos *et al.*, 2008 et issu de Avice et Etienne, 2014).

sur le rôle de ces pro-peptides comme régulateurs de la sénescence foliaire mais leur rôle régulateur a déjà été démontré dans d'autres processus comme la régulation de la germination du grain d'orge (Cambra *et al.*, 2012a ; 2012b).

Par ailleurs, l'existence d'inhibiteurs de protéases a été démontrée chez plusieurs espèces de plantes. La relation protéase-inhibiteur la plus reconnue est celle ayant lieu entre les protéases à cystéine et les inhibiteurs de type cystatine (Prins *et al.*, 2008 ; Diaz-Mendoza *et al.*, 2014 ; Eason *et al.*, 2014). En effet, la formation de complexes CP-cystatine a été mise en évidence dans les feuilles sénescents d'épinards (Tajima *et al.*, 2011). D'autre part, la surexpression de la cystatine BoCPI-1 dans les feuilles de brocoli a pour conséquences une diminution de l'activité protéasique totale, un ralentissement de la dégradation des chlorophylles et un retard de sénescence (Eason *et al.*, 2014).

Enfin une corrélation inverse est observée entre la sénescence et l'activité de BnD22 chez le colza (Reviron *et al.*, 1992 ; Etienne *et al.*, 2007 ; Desclos *et al.*, 2008). BnD22 est une WSCP « water soluble chlorophyll binding protein » qui peut représenter jusqu'à 1% de la quantité de protéines solubles dans les jeunes feuilles de colza (Downing *et al.*, 1992) et présente le motif spécifique des inhibiteurs de protéases de type Kunitz (Reviron *et al.*, 1992). Son rôle en tant qu'inhibiteur de protéases à sérine a clairement été démontré dans les feuilles de colza et une relation inverse entre la sénescence et la concentration de BnD22 a été établi dans les feuilles sénescents soumises ou non à une limitation en N minéral (Desclos *et al.*, 2008 ; Avice *et Etienne*, 2014) (**Figure B-41**).

B.V. Problématique et Objectifs de recherche

La synthèse bibliographique a mis en avant le fait que le colza présente un mauvais bilan agro-environnemental vis-à-vis de l'azote. En effet, le colza est caractérisé par une faible EUA avec seulement 50% du N apporté par les fertilisants qui est retrouvé dans les graines (Schjoerring *et al.*, 1995) conduisant ainsi à un faible rendement grainier par unité d'azote apportée et à des risques de pollutions par lixiviation ou production de GES. En effet, par le passé les génotypes de colza ont été sélectionnés principalement pour leur performance agronomique sous forts apports azotés et les variétés actuelles présentent des baisses de rendement significatives en conditions de bas intrants azotés. Parmi les pistes d'amélioration du bilan agro-environnemental, quelques études sur la variabilité génotypique de colza de printemps (Balint *et Rengel*, 2008 ; 2011) et d'hiver (Ulas *et al.*, 2013, Girondé *et al.*, 2015a, 2016) ont été réalisées sous contraintes azotées et la sélection d'hybride a récemment permis d'augmenter le rendement lors d'une carence en N (Gehring *et al.*, 2007 ; Kessel *et al.*, 2012). L'amélioration du bilan agro-environnemental de la culture de colza par le biais de l'optimisation de l'EUA associée à une amélioration du rendement en huile chez le colza en

conditions de faibles intrants azotés, constitue le défi majeur du programme Investissement-Avenir RAPSODYN (coordination : Dr. Nathalie Nési, IGEPP-INRA du Rheu) au sein duquel s'inscrit directement ce travail de thèse.

Dans un contexte de limitation des apports en N, l'optimisation de l'ERA constitue l'un des principaux leviers d'amélioration de l'EUA chez le colza (Avice et Etienne, 2014). En effet, lors des stades végétatifs, l'EUA est principalement limitée par une faible ERA lors de la sénescence séquentielle foliaire (Malagoli *et al.*, 2005a, b) tandis que lors des stades reproducteurs la plus forte EUA chez certains géotypes de colza de printemps serait associée à une plus forte remobilisation du N des péricarpes lors de la sénescence des siliques (Balint et Rengel, 2011). Ainsi la remobilisation des composés azotés est particulièrement associée aux processus de sénescence. La sénescence permet le recyclage des constituants cellulaires *via* la dégradation des macromolécules, telles que les protéines, vers les tissus en croissance, les organes de stockage ou encore les organes reproducteurs pour la formation et le remplissage des graines (Gregersen, 2011). De plus, il a été démontré que les géotypes présentant une meilleure ERA foliaire présentaient également une plus forte capacité de dégradation des protéines solubles lors de la sénescence foliaire associée à une limitation en N (Girondé *et al.*, 2015a).

Afin d'optimiser l'ERA et *in fine* l'EUA chez le colza, l'objectif principal de cette thèse visait à **caractériser la machinerie protéolytique (identification des protéases et régulation de la protéolyse) associée à une remobilisation efficace du N pendant la sénescence foliaire séquentielle et la sénescence des siliques.**

Afin d'atteindre cet objectif, il a été nécessaire de répondre à trois questions distinctes :

➤ **Quelle est la machinerie protéolytique impliquée dans une remobilisation efficace du N foliaire aux stades végétatifs lors de la sénescence séquentielle ?**

Pour répondre à cette question, les perturbations physiologiques et biochimiques ainsi que les activités protéasiques associées à la sénescence foliaire séquentielle ont été suivies au sein d'une feuille mature entrant en sénescence chez trois géotypes de colza présentant des ERA contrastées (Aviso/Ténor vs Samouraï). Les plantes ont été cultivées en serre au stade rosette et soumises à une alimentation limitée ou non en nitrate afin d'étudier l'impact du niveau de nutrition en N sur la machinerie protéolytique. De plus, les teneurs en phytohormones ont été mesurées en cinétiques chez Ténor et Samouraï afin d'appréhender la régulation hormonale des activités protéasiques.

Les activités des protéases ont été étudiées grâce à une technique innovante : ABPP « Activity-based protein profiling », basée sur l'utilisation de sondes activité-dépendantes spécifiques de différentes classes de protéases permettant à la fois de quantifier l'activité

protéasique mais également d'identifier les protéases responsables de ces activités. Cette technique a été mise au point sur colza et réalisée en collaboration avec l'équipe du Prof. Renier A.L. van der Hoorn au sein du « Plant Chemetics Laboratory, Department of Plant Sciences » à l'Université d'Oxford en Angleterre. Par ailleurs, la mesure des teneurs en phytohormones a été réalisée grâce à une collaboration avec le Prof. Alain Bouchereau au sein de l'UMR 1349 Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, INRA, Université de Rennes 1, Le Rheu, France mais également avec l'équipe du Pr Tae-Hwan Kim « Department of Animal Science, Institute of Agricultural Science and Technology, College of Agriculture and Life Science, Chonnam National University, Gwangju, South Korea » dans le cadre d'un Partenariat Hubert Curien STAR franco-coréen, campus France.

Les résultats de ces travaux sont regroupés dans 2 articles présentés dans les chapitres §D.I. et D.III :

Article 1: Poret M., Chandrasekar B., van der Hoorn R.A.L., Avice J.C. (2016). Characterization of senescence-associated protease activities involved in the efficient protein remobilization during leaf senescence of winter oilseed rape. *Plant Science* 246, 139–153.

Article 2: Poret M., Chandrasekar B., Déchaumet S., Bouchereau A., Kim T.H., Lee B.R., van der Hoorn R.A.L., Avice J.C. A genotypic comparison reveals that the improvement of nitrogen remobilization efficiency in oilseed rape leaves is related to specific patterns of senescence-associated proteases activities and phytohormones. (soumis à *Plant Science* fin octobre 2016)

➤ **La sénescence cotylédonaire peut-elle servir de modèle d'étude de la machinerie protéolytique impliquée dans la sénescence foliaire ?**

Afin de répondre à cette question, les modifications biochimiques ainsi que les modifications des activités protéasiques ont été étudiées au sein de cotylédons matures entrant en sénescence chez deux génotypes de colza présentant des ERA différentes (Ténor et Samourai) dont la machinerie protéolytique avait été déjà caractérisée lors de la sénescence foliaire séquentielle dans l'article 2 (§D.III.). Ces plantes ont été cultivées en serre et soumis ou non à une limitation en nitrate. De plus, des infiltrations exogènes de phytohormones ont été effectuées sur des cotylédons matures afin d'étudier la régulation phytohormonale des activités protéasiques postulée dans l'article 2.

Ces travaux sont rassemblés dans un article qui sera présenté dans le chapitre §D.VI. :

Article 3 : Poret M., Chandrasekar B., van der Hoorn R.A.L., Coquet L., Cosette P., Jouenne T., Avice J.C. The senescence of cotyledons: a model to explore the genotypic variability of proteolysis machinery and their regulation associated with the nitrogen remobilization efficiency during leaf senescence of *Brassica napus* L. (soumis à Plant Physiology and Biochemistry en novembre 2016).

➤ **Quelle est la machinerie protéolytique impliquée dans une remobilisation efficace du N des péricarpes lors de la sénescence des siliques aux stades reproducteurs ?**

Afin de répondre à cette problématique, les teneurs en N et en protéines solubles ainsi que les modifications des activités protéasiques ont été étudiées en cinétique au sein des péricarpes lors de la sénescence monocarpique chez des plantes de colza cultivées en serre (génotype Aviso). En parallèle, les teneurs en N et en protéines solubles ont été mesurées au sein des graines.

Ces travaux sont regroupés dans un article qui sera présenté dans le chapitre §D.II. :

Article 4: Poret M., D’Hooghe P., Chandrasekar B., van der Hoorn R.A.L., Trouverie J., Avice J.C. Characterization of proteolytic machinery associated with the senescence of silique walls and the nitrogen remobilization efficiency of *Brassica napus* L. (soumis à Frontiers in Plant Science fin octobre 2016).

Chapitre C
Matériels et Méthodes



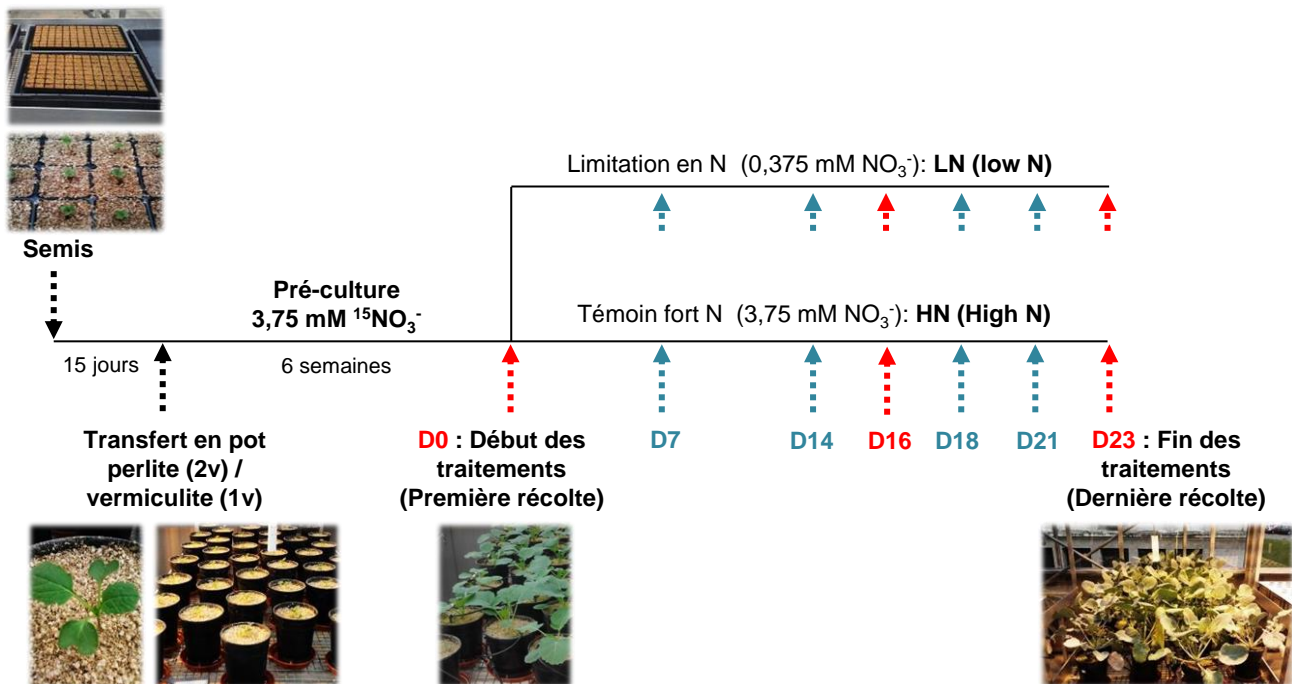


Figure C-1: Dispositif expérimental mis en place pour la culture de 3 géotypes de colza au stade rosette en condition non limitante ou limitante en nitrate.

Les flèches rouges correspondent aux dates de récoltes tandis que les flèches bleues correspondent aux dates pour lesquelles seules des mesures SPAD® et Multiplex® ont été effectuées.

Tableau C-1 : Composition de la solution nutritive Hoagland ¼

Macroéléments	Concentration (mM)	Microéléments	Concentration (µM)
Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1,25* ou 0**	H ₃ BO ₃	14
KNO ₃	1,25* ou 0,375**	MnSO ₄	5
KH ₂ PO ₄	0,25	ZnSO ₄	3
MgSO ₄	0,5	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,7
EDTA, 2NaFe,3H ₂ O	0,2	CuSO ₄	0,7
CaCl ₂ 2H ₂ O	1,25**	CoCl ₂	0,1
KCl	0,875**		

* Solution HN (3,75 mM nitrate) / ** Solution LN (0,375 mM nitrate)

Chapitre C: Matériels et Méthodes

C.I. Conditions de culture et dispositifs expérimentaux

C.I.1 Culture en conditions contrôlées de 3 génotypes de colza au stade rosette (Articles 1 et 2)

Le dispositif expérimental décrit dans cette partie a été mis en place afin de caractériser les activités protéasiques impliquées dans la remobilisation des protéines solubles lors de la sénescence foliaire au stade végétatif chez *Brassica napus* L. en condition non limitante (High Nitrogen : HN) ou limitante en nitrate (Low Nitrogen : LN). Cette étude a été réalisée sur un rang foliaire mature entrant en sénescence pendant la durée des traitements chez trois génotypes ayant des ERA contrastées (Girondé *et al.*, 2015a):

- Aviso et Ténor présentent une faible ERA en condition HN mais une forte ERA en condition LN. Ces génotypes sont capables de maintenir leur production de biomasse malgré la limitation en N.
- Samouraï présente une faible ERA en condition HN et LN. Ce génotype n'est pas capable de maintenir sa production de biomasse lors d'une limitation en N.

La première étude aboutissant à l'**article 1** (Chapitre D.I.) a été focalisée uniquement sur le génotype Aviso. Cette étude avait pour objectifs (i) de caractériser les activités protéasiques associées à la sénescence foliaire en condition HN et LN et (ii) d'identifier les protéases jouant un rôle majeur lors de la sénescence foliaire chez le colza.

La deuxième étude présentée dans l'**article 2** (Chapitre D.III.) a été réalisée sur les génotypes Ténor et Samouraï. Cette étude avait pour objectifs (i) de caractériser les activités protéasiques associées à la sénescence foliaire pour chaque génotype, (ii) de comparer ces activités afin d'identifier des protéases pouvant expliquer les différences de ERA entre ces deux génotypes et enfin (iii) d'étudier les teneurs en phytohormones des deux génotypes pendant la sénescence afin d'observer une potentielle régulation des activités protéasiques par les phytohormones.

Le dispositif expérimental utilisé est identique pour les deux études décrites précédemment (**Figure C-1**). Avant semis, les graines des trois génotypes ont été stérilisées en surface 30 s dans de l'éthanol à 80% (v/v) puis 10 min dans de l'hypochlorite de sodium à 20% (v/v). Les graines rincées abondamment avec de l'eau ultrapure ont été semées sur vermiculite pure en alvéoles (1 graine/alvéole) et alimentées avec de la solution Hoagland ¼ (**Tableau C-1**).

Après 18 jours les plantules ont été transférées en pot de 2,5 L contenant un mélange perlite/vermiculite (2v/1v ; 1 plante par pot). Les plantes ont été arrosées 2 fois par jour avec 30 mL de solution Hoagland ¼ pendant une période de 6 semaines jusqu'à apparition de 14 à 15 rangs foliaires. Afin d'étudier avec précision le taux de remobilisation de l'azote foliaire, la

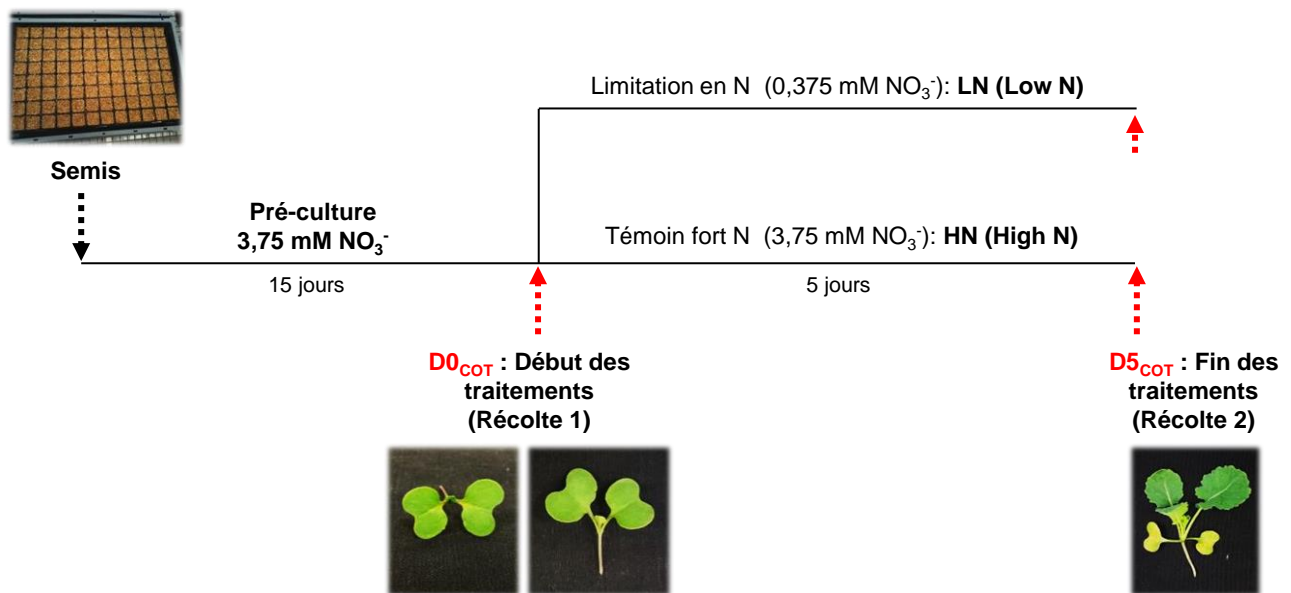


Figure C-2: Dispositif expérimental mis en place pour la culture de 2 génotypes de colza (Ténor et Samourai) au stade cotylédonaire afin d'étudier les mécanismes protéolytiques associés à la sénescence des cotylédons en condition non limitante ou limitante en nitrate.

solution nutritive a été enrichie en ^{15}N ($^{15}\text{NO}_3^-$) avec un excès isotopique de 2,5 atom% jusqu'à obtention d'un marquage homogène de l'ensemble de la plante pendant les 6 premières semaines de pré-culture (Salon *et al.*, 2014). A la suite de cette période de marquage au ^{15}N , les pots ont été rincés abondamment à l'eau osmosée afin d'éliminer le ^{15}N en surplus.

A partir de cette date D0 (début de la période de « chasse » du marquage et début des traitements, **Figure C-1**), les plantes ont été séparées en deux lots. Le premier lot a été bien alimenté en nitrate (NO_3^-) avec un arrosage, deux fois par jour, de 30 mL de solution Hoagland $\frac{1}{4}$ non marquée (traitement « High Nitrate » HN : 3,75 mM NO_3^-) tandis que le deuxième lot a subi une limitation en nitrate via un arrosage avec une solution Hoagland $\frac{1}{4}$ non marquée et modifiée contenant 10 fois moins de NO_3^- (traitement « Low Nitrate » : 0,375 mM NO_3^- avec une compensation des éléments Ca et K par ajout de 1,25 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et de 0,875 mM de KCl) (**Tableau C-1**). Les plantes ont été cultivées ainsi pendant 23 jours et les rangs foliaires ont été numérotés par ordre d'apparition sur la plante, le rang n°1 (« Leaf 1 » : L1) correspondant à la feuille la plus vieille.

Pendant toute la durée de la culture, la thermopériode était de 20°C/16h (jour) et 15°C/8h (nuit) sous lumière naturelle supplémentée par des lampes à vapeur de sodium haute pression (MASTER GreenPower T400W, Philips) dispensant un rayonnement photosynthétiquement actif (PAR, « Photosynthetically Active Radiation ») d'environ 400 μmoles de photons. $\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ au niveau de la canopée.

L'expérimentation a consisté à suivre en cinétique le développement d'une feuille mature entrant en sénescence pendant la durée du traitement. Pour cela, une feuille ayant atteint sa maturité à D0, c'est-à-dire présentant une valeur maximale de surface foliaire (déterminée par le planimètre LI-COR 300) et de chlorophylles (déterminée par la pince SPAD), a été sélectionnée. Cette feuille correspondant à la feuille de rang n°12 (L12 : « Leaf 12 ») a été récoltée en cinétique (limbe et pétiole séparés) après 0, 7, 14, 16, 18, 21 et 23 jours de traitement. Pour chaque date et chaque traitement, 3 plantes correspondant aux 3 répétitions biologiques ont été récoltées et les échantillons ont été immédiatement congelés dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C.

C.I.2 Culture en conditions contrôlées de 2 géotypes de colza au stade cotylédonaire (Article 3)

Le dispositif expérimental décrit dans cette partie (**Figure C-2**) a été mis en place afin de caractériser les activités protéasiques impliquées lors de la sénescence des cotylédons chez *Brassica napus* L. Cette étude a été réalisée sur deux géotypes à ERA contrastées (Ténor et Samourai) décrits précédemment au § C.I.1.

Les graines de deux géotypes (Ténor et Samourai) ont été semées sur vermiculite en alvéoles (1 graine/alvéole) et alimentées avec de la solution Hoagland $\frac{1}{4}$ (**Tableau C-1**) jusqu'à

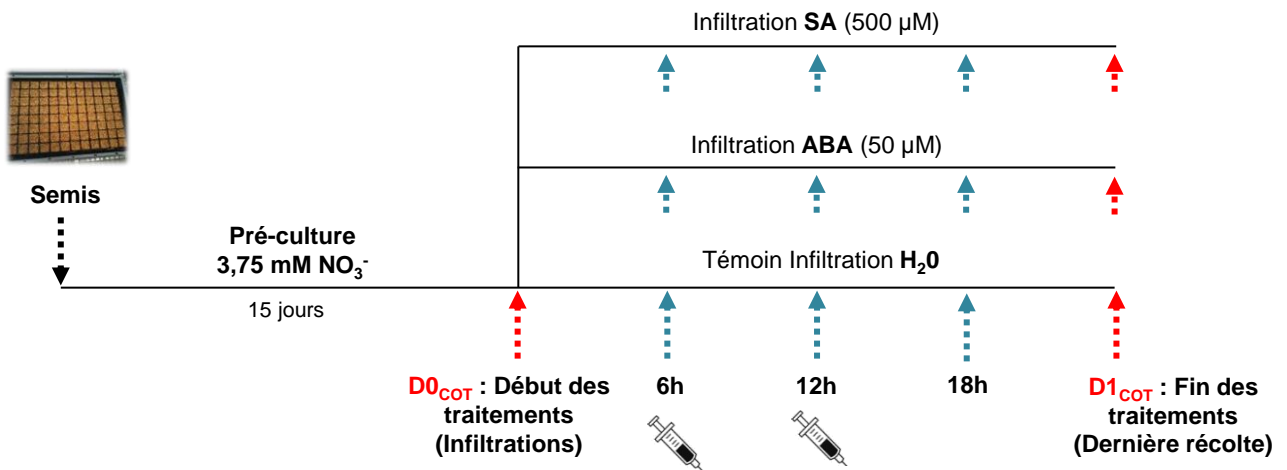
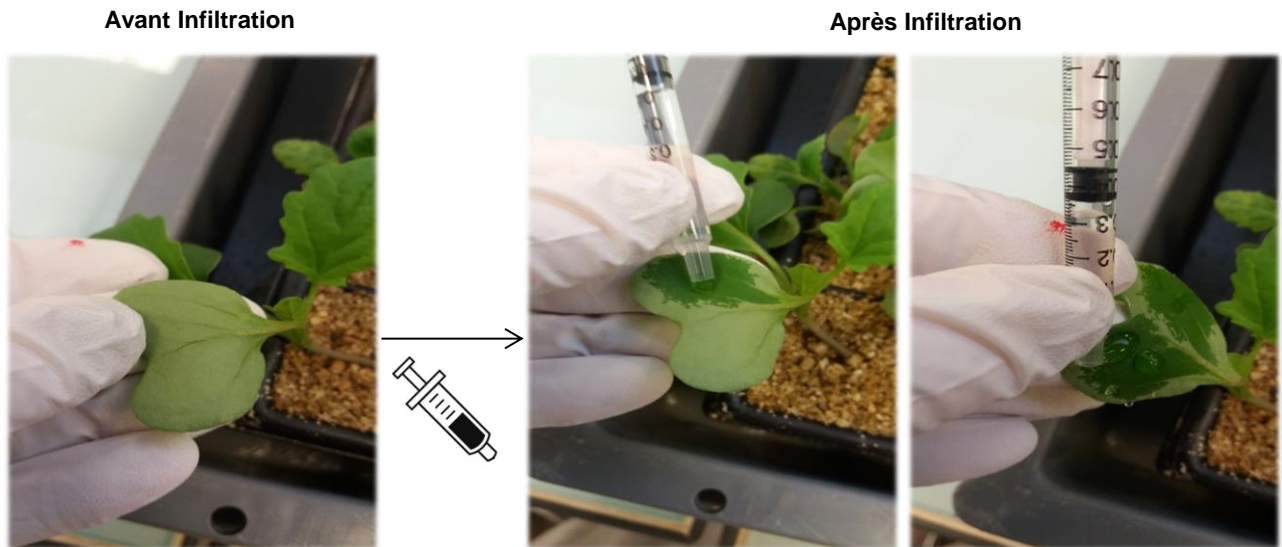
A**B**

Figure C-3: Dispositif expérimental utilisé afin d'étudier l'effet de l'application de phytohormone sur la sénescence des cotylédons de colza (c.v. Ténor).

Le protocole expérimental est décrit en (A). Les flèches rouges correspondent aux dates de récoltes tandis que les flèches bleues correspondent aux dates pour lesquelles seules des mesures SPAD® et Multiplex® ont été effectuées.

(B) Illustration de la technique d'infiltration des phytohormones par seringue au niveau d'une perforation effectuée à l'aide d'une pointe d'aiguille à la surface de la face abaxiale des cotylédons.

obtention de plantules portant des cotylédons matures c'est-à-dire ayant atteint leur taille maximale (15 jours).

A partir de cette date ($D0_{\text{COT}}$: Day 0 pour les cotylédons) deux dispositifs expérimentaux ont été mis en place afin (i) d'étudier les mécanismes protéolytiques mis en jeu lors de la sénescence des cotylédons de colza en condition non limitante (High Nitrogen : HN) ou limitante en nitrate (Low Nitrogen : LN) et (ii) d'identifier l'effet de l'application de phytohormones sur la sénescence des cotylédons et les mécanismes protéolytiques associés.

C.1.2.a Etude de la sénescence des cotylédons en conditions HN et LN

A partir de $D0_{\text{COT}}$, les plantules ont été séparées en deux lots (**Figure C-2**). Le premier lot a été bien alimenté en nitrate (NO_3^-) avec de la solution Hoagland $\frac{1}{4}$ (traitement « High Nitrate » HN : 3,75 mM NO_3^-) tandis que le deuxième lot a subi une limitation en nitrate via une solution Hoagland $\frac{1}{4}$ modifiée contenant 10 fois moins de NO_3^- (traitement « Low Nitrate » : 0,375 mM NO_3^-) (**Tableau C-1**). Les feuilles cotylédonaires ont été récoltées à $D0_{\text{COT}}$ et après 5 jours de traitement ($D5_{\text{COT}}$). Pour chaque date et chaque traitement, 3 répétitions biologiques (1 répétition correspondant à 6 cotylédons) ont été récoltées et les échantillons ont été immédiatement congelés dans de l'azote liquide avant stockage à -80°C . Pendant toute la durée de la culture, la thermopériode était réglée à $20^\circ\text{C}/16\text{h}$ (jour) et $15^\circ\text{C}/8\text{h}$ (nuit) sous lumière naturelle supplémentée par des lampes à vapeur de sodium haute pression dispensant un rayonnement photosynthétiquement actif d'environ $400 \mu\text{moles de photons}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ au niveau de la canopée.

C.1.2.b Etude de l'effet de l'application de phytohormones sur la sénescence des cotylédons

A partir de $D0_{\text{COT}}$, les plantules ont été séparées en trois lots (**Figure C-3A**). Tous les lots ont été bien alimentés en nitrate (NO_3^-) avec de la solution Hoagland $\frac{1}{4}$ (3,75 mM NO_3^- , **Tableau C-1**). Par ailleurs, le premier lot de cotylédons a subi une infiltration de 1 mL d'eau ultrapure, le deuxième lot a été infiltré avec 1 mL d'acide absissique (ABA) ($50\mu\text{M}$) et le troisième lot a été infiltré avec 1 mL d'acide salicylique (SA) ($500\mu\text{M}$). L'infiltration a été réalisée sur la face abaxiale du cotylédon à l'aide d'une seringue sans aiguille par simple pression au niveau d'une petite perforation effectuée en surface du cotylédon (**Figure C-3B**). L'infiltration a été répétée, sur les mêmes cotylédons, 6 et 12h après la première infiltration. La progression de la sénescence des cotylédons a été suivie par les niveaux de chlorophylles mesurés à $D0_{\text{COT}}$ puis après 1, 2 ou 3 jours de traitement à l'aide de la pince SPAD. Les cotylédons ont été récoltés à $D0_{\text{COT}}$ puis après 3 jours de traitement ($D3_{\text{COT}}$). Pour chaque date et chaque traitement, 3 répétitions biologiques (1 répétition correspondant à 6 cotylédons) ont été récoltées et les échantillons ont été immédiatement congelés dans de l'azote liquide avant stockage à -80°C . Pendant toute la durée de la culture, la thermopériode a été fixée à $20^\circ\text{C}/16\text{h}$ (jour) et $15^\circ\text{C}/8\text{h}$

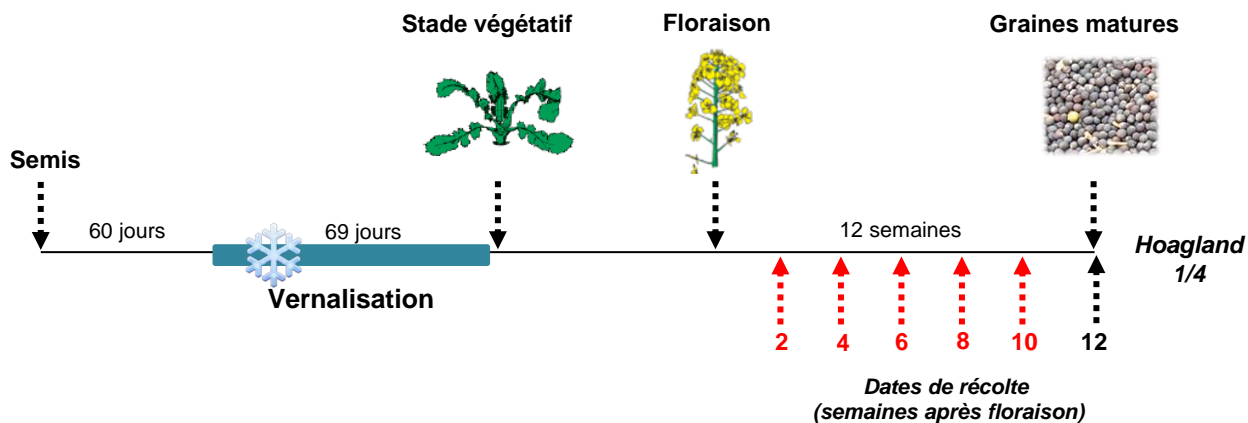


Figure C-4: Dispositif expérimental mis en place pour l'étude des mécanismes protéolytiques associés à la sénescence des siliques de colza (génotype Aviso).

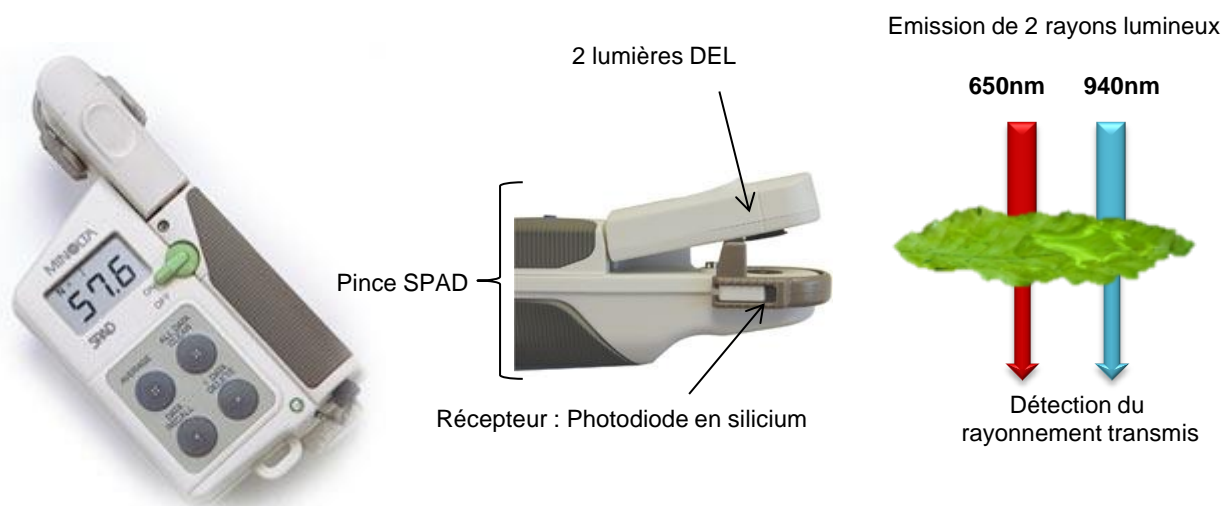


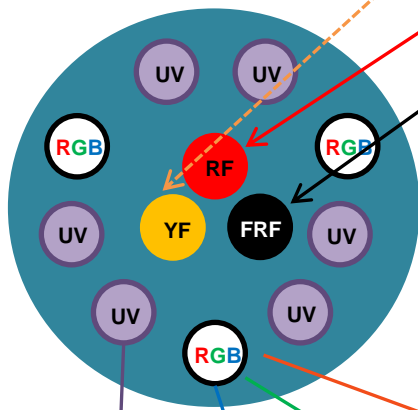
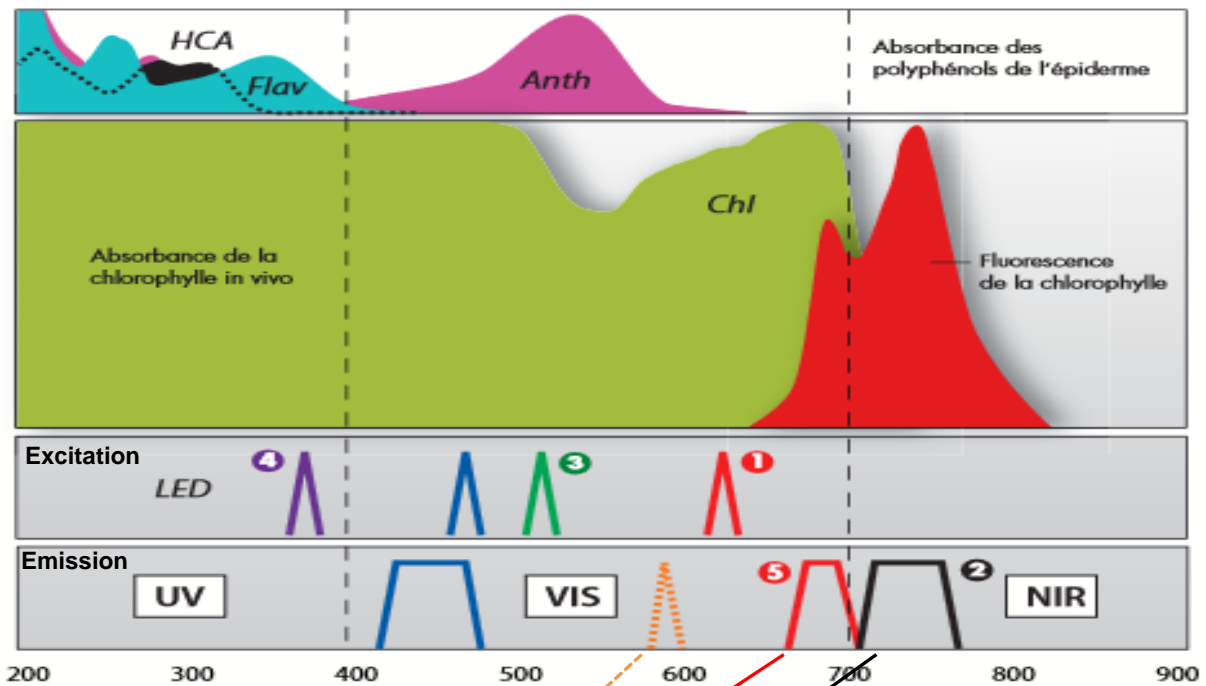
Figure C-5: SPAD modèle 502 (Minolta, Japon) et principe de la mesure transmittance correspondant au rapport entre le flux lumineux (à 650 et 940 nm) transmis à travers le tissu végétal et le flux lumineux incident produit par la pince SPAD.

(nuit) sous lumière naturelle supplémentée par des lampes à vapeur de sodium haute pression dispensant un rayonnement photosynthétiquement actif d'environ 400 $\mu\text{moles de photons}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ au niveau de la canopée.

C.I.3 Culture en conditions contrôlées au stade reproducteur (génotype Aviso) (Article 4)

Ce dispositif expérimental a été mis en place afin de caractériser les activités protéasiques impliquées lors de la sénescence des siliques chez *Brassica napus* L. afin d'identifier les principales classes de protéases responsables de la remobilisation du N des enveloppes de siliques (péricarpes) vers des graines. Cette étude a été réalisée sur le génotype Aviso et la culture a été effectuée dans le cadre des travaux de thèse réalisés par Philippe D'Hooghe (D'Hooghe, 2013) (Figure C-4).

Avant semis, les graines du génotype Aviso ont été stérilisées en surface 30 s dans de l'éthanol à 80% (v/v) puis 10 min dans de l'hypochlorite de sodium à 20% (v/v). Les graines rincées abondamment à l'eau ultra-pure ont été mises à germer dans des pots de 0,5L contenant un mélange de perlite/vermiculite (2V/1V). Pendant 60 jours, la thermopériode était fixée à 20°C/16h (jour) et 15°C/8h (nuit) sous lumière naturelle supplémentée par un éclairage via des lampes à vapeur de sodium haute pression dispensant un rayonnement photosynthétiquement actif d'environ 400 $\mu\text{moles de photons}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ au niveau de la canopée. Par la suite, une période de vernalisation de 69 jours a été appliquée (8°C/10h (jour) et 4°C/14h (nuit)). Après vernalisation, chaque plante a été transférée en pot de 4 L contenant un mélange de perlite/vermiculite (2V/1V) sous les mêmes conditions contrôlées que la période pré-vernalisations. Durant toute la culture, les plantes ont été alimentées avec de la solution Hoagland $\frac{1}{4}$ (Tableau C-1) et afin d'adapter les apports hydriques au stade de développement des plantes, le volume de solution nutritive apporté chaque jour par arrosage automatique a été réalisé de la façon suivante : 60 mL/plante/jour pendant la culture au stade rosette et la vernalisation, 90 mL au début de la montaison, 120 mL lorsque l'inflorescence principale est visible, 150 mL à la floraison et 180 mL pendant le remplissage des graines. La formation des graines matures a duré 12 semaines à partir de la chute des premiers pétales et les siliques ont été récoltées 2, 4, 6, 8 et 10 semaines après floraison. Les siliques récoltées ont été classées selon leur longueur et les siliques de 4 à 5,9 cm ont été retenues et disséquées pour séparer les péricarpes et les graines. Une partie des péricarpes a été directement congelée dans l'azote liquide puis stockée à -80°C afin de réaliser des analyses protéomiques tandis que l'autre moitié a été lyophilisée afin de réaliser des analyses biochimiques.



Emission (nm)	Excitation			
	UV	Bleu	Vert	Rouge orange
YF (590)	YF_UV	YF_B-R	YF_G-R	YF_R-R
RF (685)	RF_UV	RF_B	RF_G	RF_R
FRF (735)	FRF_UV	FRF_B	FRF_G	FRF_R

•Indice de chlorophylles (SFR_R) = FRF_R / RF_R

•Indice d'anthocyanes (ANTH_RG) = $\text{Log} (FRF_R / FRF_G)$

Figure C-6: Principe de fonctionnement du Multiplex®. Les différentes raies lumineuses émises par fluorescence: YF=« Yellow Fluorescence » à 590 nm (6), RF= « Red Fluorescence » à 685 nm (5), FRF= « Far Red Fluorescence » à 735 nm (2); Les différentes longueurs d'ondes d'excitation: UV à 375 nm (4), bleue à 450 nm (7), verte à 520 nm (3), rouge-orangée à 630 nm (1). Les signaux de fluorescences mesurés pour chaque longueur d'onde d'excitation servent ensuite aux calculs des différents indices chlorophylles (SFR_R) et anthocyanes (ANTH_RG) (Bellow, 2012).

C.II. Mesure de l'état physiologique de la plante

C.II.1 Mesure de la biomasse et de la surface foliaire

A chaque récolte, la surface du limbe des feuilles cotylédonaire a été déterminée par un planimètre LI-COR 300 (LICOR, Lincoln, Nebraska, USA). Les échantillons ont ensuite été pesés à l'état frais puis des aliquotes de 200 mg de matériel frais ont été réalisés. Une partie des aliquotes a été directement plongée dans l'azote liquide et stockée à -80°C pour la réalisation des analyses protéomiques et biochimiques. Une autre partie des aliquotes a été lyophilisée, la matière sèche a été mesurée et les échantillons ont été utilisés lors des analyses élémentaires et biochimiques.

C.II.2 Mesure de la teneur relative en chlorophylles et en anthocyanes

La dégradation des chlorophylles est l'un des premiers signes visibles de l'entrée en sénescence (Ougham *et al.*, 2005). De plus, l'accumulation d'anthocyanes est généralement considérée comme un symptôme de stress abiotique notamment en cas de limitation en minéraux tels que le soufre, le phosphore et l'azote chez de nombreuses plantes (Noodén *et al.*, 1996 ; Chalker-Scott *et al.*, 1999; Stewart *et al.*, 2001; Diaz *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2008), y compris chez le colza (D'Hooghe *et al.*, 2013). C'est pourquoi, les niveaux d'accumulation en chlorophylles (SPAD et Multiplex®) et en anthocyanes (Multiplex®) ont été mesurés.

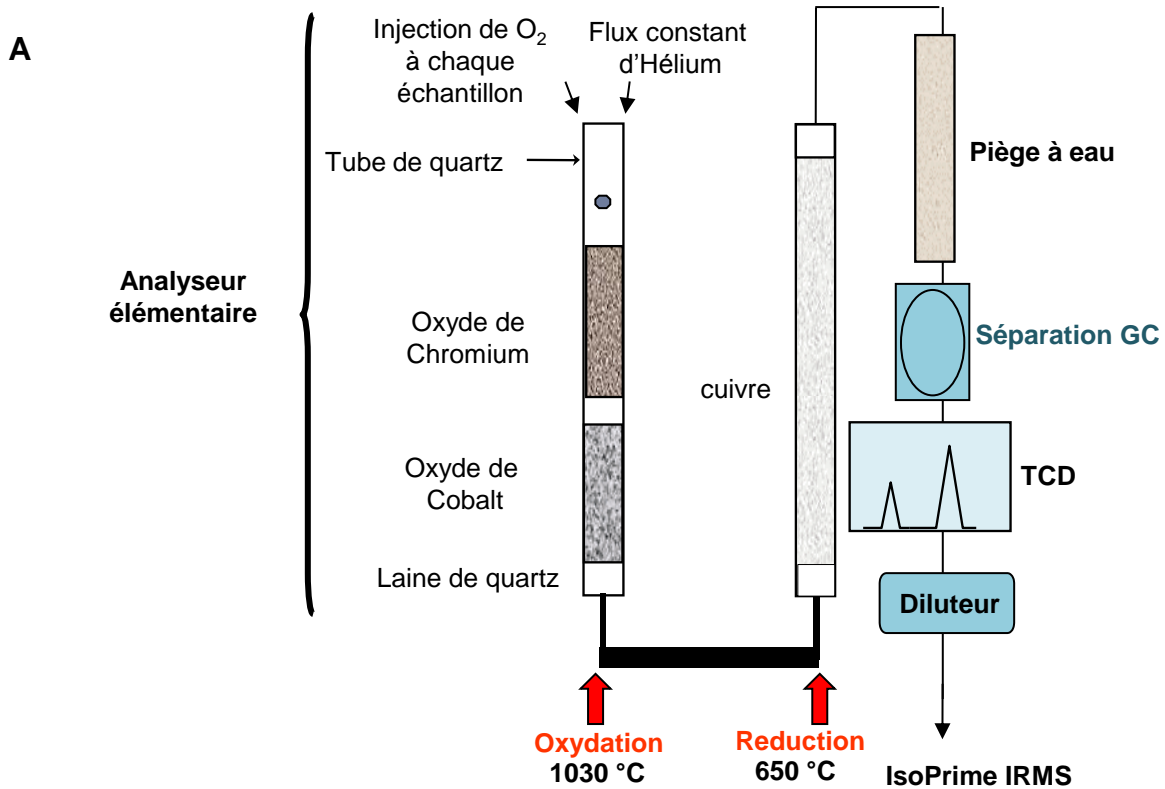
C.II.2.a La pince SPAD :

Le système « Soil Plant Analysis Development » (SPAD modèle 502, Minolta, Japon) (**Figure C-5**) permet d'estimer le niveau d'accumulation en chlorophylles des feuilles. Cette pince possède une fenêtre par laquelle est émise une lumière rouge (650 nm) et infrarouge (940 nm). Celles-ci, après être passées au travers de la feuille (par transmittance), sont captées par un récepteur qui les convertit en un signal analogique. La valeur SPAD est alors calculée par le microprocesseur. Le ratio entre les intensités lumière rouge (650nm, partiellement absorbée par les chlorophylles) et lumière infrarouge (>800nm, non absorbée) permet de déterminer le niveau d'accumulation en chlorophylles exprimé en unité arbitraire (ou unité SPAD).

C.II.2.b Le Multiplex® :

Le Multiplex® (Force-A, Orsay ; **Figure C-6**) permet de réaliser des mesures de fluorescence à distance (sans contact) sur plante entière ou au niveau de la feuille. Différents signaux de fluorescence sont mesurés à l'aide de filtres de couleurs (bleu, jaune) correspondants aux émissions de fluorescences obtenues par l'excitation des tissus végétaux à des rayonnements de certaines longueurs d'ondes (rouge 630nm, vert 520nm, bleu 450nm, UV 375nm). Les valeurs de ces différents signaux sont utilisées pour le calcul du niveau de chlorophylles et d'anthocyanes.

Pour traiter les données enregistrées par le Multiplex®, la moyenne des valeurs de bruit de fond est préalablement retirée à tous les signaux mesurés en prenant correctement en compte la



B

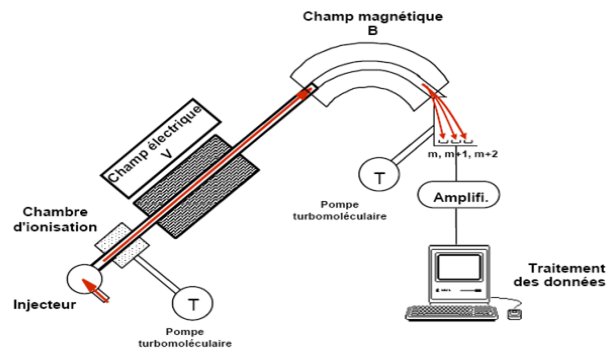


Figure C-7: Analyseur élémentaire C/N/S (EA3000, Eurovector; (A)) couplé à un spectromètre de de ratio isotopique (IRMS, Isotope Ratio Mass Spectrometer ; (B)) de marque IsoPrime (GV Instrument) utilisé pour déterminer les teneurs en N et l'abondance isotopique ¹⁵N.

(GC: Gas chromatography (chromatographie en phase gazeuse)). (TCD: Thermal Conductivity Detector (détecteur à conductibilité thermique)). De 0,7 à 2 mg de poudre lyophilisée sont déposés dans des capsules en étain qui sont placées dans un injecteur en tête de la colonne de combustion du spectromètre de masse. A la sortie de la colonne d'oxydation, les gaz de l'échantillon sont réduits en N₂ et CO₂ par passage sur une colonne de réduction. L'azote gazeux est injecté dans le spectromètre de masse où il est d'abord ionisé, puis dévié par un champ magnétique. 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.

soustraction du bruit de fond. Les différents indices testés ont été calculés selon les formules suivantes:

- Indice de chlorophylles (SFR_R) = FRF_R/RF_R , avec FRF_R : fluorescence chlorophyllienne dans l'infrarouge et RF_R : fluorescence chlorophyllienne dans le rouge.
- Indice d'anthocyanes (ANTH_RG) = $\log (FRF_R/FRF_G)$, avec FRF_G : longueur d'onde spécifique des anthocyanes dans le vert.

C.III. Méthodes d'analyses élémentaires et biochimiques

C.III.1 Détermination des quantités de N total et de ^{15}N

Les quantités de N et de ^{15}N des tissus ont été déterminées grâce à, un analyseur élémentaire C/N/S (EA3000, Eurovector, Milan, Italie) couplé à un spectromètre de masse de rapport isotopique (IRMS de marque Isoprime, GV Instrument, Manchester, Royaume-Uni) (**Figure C-7**) sur la plateforme Platin' (Université de Caen Normandie).

Les échantillons lyophilisés ont été broyés et 1,5 mg de poudre fine ont été déposés dans des nacelles en étain. Chaque échantillon a été injecté dans la colonne de combustion en présence d'un flux constant d'hélium pour éviter une contamination par l'air. Les échantillons subissent une combustion totale afin de passer sous forme gazeuse : N_2 , CO_2 , H_2O et oxydes d'azote. Un passage sur une colonne de cuivre métallique permet la réduction de ces gaz en N_2 et CO_2 . Après piégeage de l'eau, le N_2 et le CO_2 sont séparés sur une colonne de chromatographie en phase gazeuse (45°C), avant une injection dans le spectromètre de masse isotopique. Les gaz N_2 et CO_2 sont ionisés puis accélérés dans une chambre électrique, avant d'être déviés dans un champ électromagnétique. L'angle de déviation dépend de la masse (m) et de la charge (z). L'ionisation des gaz polarisant toutes les molécules de N_2 de la même manière, seule leur masse modifie l'angle de déviation. Ainsi, la déviation du N_2 de masse 28 ($^{14}\text{N}^{14}\text{N}$) est plus grande que celle du N_2 de masse 29 ($^{14}\text{N}^{15}\text{N}$), elle-même plus grande que celle du N_2 de masse 30 ($^{15}\text{N}^{15}\text{N}$). Les ions sont collectés sur 3 détecteurs et la somme des ions correspond à la quantité totale de N.

L'analyse IRMS fournit directement le pourcentage d'azote (% N) dans la matière sèche (MS) qui est utilisé pour calculer la quantité de N (QN) dans un tissu donné :

$$\text{QN} = (\% \text{ N} * \text{MS}) / 100$$

avec MS = matière sèche de l'échantillon

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

$$\text{A \%} = 100 * [^{15}\text{N} / (^{15}\text{N} + ^{14}\text{N})]$$

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



Figure C-8 : Système UPLC-ESI (+/-) –TQD.

Ce système est constitué d'une chromatographie liquide ultra haute performance (UPLC) (Acquity de Waters, Guyancourt) sur une colonne de type phase inverse couplée à une double détection UV_Visible (barrette de diode) et spectrométrie de masse à triple quadripôle (Acquity de Waters)

L'excès isotopique (E %) correspond à 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 0,36735 %

$$E (\%) = A (\%) - 0,36735$$

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

$$Q^{15}\text{N} = [E (\%) * Q\text{N}] * 1000$$

C.III.2 Détermination des teneurs en phytohormones

Les phytohormones ont été extraites à partir de 200 mg de matériel frais préalablement broyé à l'azote liquide. A 200 mg de MF a été ajouté 1 mL de tampon d'extraction (méthanol 80%, acide formique 1% et eau ultrapure 19% (v/v/v)). Après 5 min dans un bain à ultrason à 4°C, les échantillons ont été agités 30 min à température ambiante et centrifugés (12 000 g, 10 min, 4°C). Le surnageant obtenu contenant les phytohormones a été collecté et une seconde extraction a été réalisée de la même façon à partir du culot restant. Les deux surnageants provenant des deux extractions ont été mélangés et évaporés au SpeedVac. Finalement, le culot après évaporation a été resuspendu dans 100 μL de méthanol acidifié (méthanol 99% et acide formique 1%).

Les échantillons ont ensuite été analysés par UPLC-ESI (+/-) -TQD (**Figure C-8**) comme décrit par [Pan et al. \(2010\)](#) à la plateforme P2M2 (Profilage Métabolique et Métabolomique, IGEPP, INRA Le Rheu, France) en collaboration avec l'équipe RCA de l'IGEPP (Sylvain Déchaumet et Alain Bouchereau). En résumé, l'extrait obtenu est analysé par chromatographie liquide ultra haute performance (UPLC) (Acquity de Waters, Guyancourt) sur une colonne de type phase inverse couplée à une double détection en UV_Visible (barrette de diode) et en spectrométrie de masse à triple quadripôle (Acquity de Waters) qui permet une spécificité et une sensibilité compatible avec la quantification des phytohormones.

L'UPLC est capable d'opérer des séparations sur des colonnes de faible granulométrie (1,8 μm), la résolution chromatographique est largement améliorée et les temps d'analyse sont raccourcis. En effet, 25 minutes suffisent à séparer les phytohormones d'intérêt. La source ESI (Electro Spray Ionisation) permet en sortie du système chromatographique, une désolvatation et une ionisation, en mode positif ou négatif, des composés présents dans le flux. Les ions obtenus sont attirés et amenés à traverser les 3 quadripôles où ils subiront une sélection suivant leur rapport masse sur charge (m/z). Le principe du mode de détection MRM (Multi Reaction Monitoring) choisi consiste à ne retenir, parmi les ions formés dans la source du détecteur, que ceux dont la transition « molécule-fragment » correspond à la molécule d'intérêt. Chaque composé séparé et détecté produit un pic chromatographique dont la surface est proportionnelle à sa concentration dans l'extrait.

Tableau C-2 : Composition du tampon Laemmli 2X (Laemmli, 1970)

Tampon Laemmli X2 (volume final = 10 mL)	
SDS 10%	4 mL
Tris-HCL 50 mM	1,2 mL
Glycérol à 99%	2 mL
Bleu de bromophénol à 0,1%	1 mL
H ₂ O ultra pure	1,8 mL



Figure C-9 : (A) Présentation du dispositif d'électrophorèse, et des gels Stain free Mini-PROTEAN® TGX™ à déposer sur la plaque de révélation (B) et à insérer au sein du scanner Gel Doc™ EZ (Bio-Rad) (C).

C.IV. Méthodes d'analyses protéomiques

C.IV.1 Méthodes d'analyses quantitatives et qualitatives des protéines solubles

C.IV.1.a Extraction et dosage des protéines solubles

Afin d'extraire les protéines solubles, 200 mg de matériel frais ont été broyés dans de l'azote liquide puis 50 mg de polyvinylpyrrolidone (PVPP) ont été ajoutés dans le but de fixer les polyphénols végétaux pouvant interférer avec le dosage colorimétrique des protéines. Après broyage, 500 µL de tampon d'extraction citrate-phosphate (20 mM citrate, 160 mM phosphate, pH 6,8) ont été additionnés à la poudre végétale. Après centrifugation (1h, 12 000 g, 4°C), le surnageant contenant les protéines solubles est prélevé. Le culot est à nouveau centrifugé pendant 5 min (16 000 g, 4°C) et le reste de surnageant est additionné au précédent. Le volume final du surnageant est ajusté à 500 µL avec du tampon citrate-phosphate.

La concentration en protéines a été déterminée par un dosage colorimétrique en microplaque selon la méthode de Bradford (1976). A 10 µL d'échantillon, préalablement dilué 2, 5 ou 10 fois en fonction de la richesse en protéines, 200 µL de réactif de Bradford (BioAssay dilué 4 fois, Bio-Rad, Marne-la-Coquette) ont été ajoutés. Après 10 min, l'absorbance a été mesurée à 570 nm par un lecteur de microplaque (DYNEX, Guyancourt). La concentration est déterminée par rapport à une gamme étalon de sérum d'albumine bovine (BSA, Sigma-Aldrich) comprise entre 0 et 0,8 µg.µL⁻¹.

L'extraction et le dosage ont permis de déterminer la quantité de protéines solubles lors de la sénescence en fonction de la date, du traitement, du génotype et de l'organe végétal étudié mais également de mesurer la quantité de RuBisCO (§ C.IV.2.a), les activités protéolytiques associées à la sénescence (§ C.IV.2.a), et de vérifier la présence de certaines protéines par immunodétection (§ C.IV.1.b).

C.IV.1.b Transfert sur membrane PVDF (« Western blotting ») et immunodétection

L'immunodétection a été réalisée pour la protéine d'intérêt SAG12 (Senescence-specific cysteine protease SAG12). L'anticorps anti-SAG12 a été fourni par Agrisera®. Cet anticorps a été produit à partir d'un peptide dérivé de la protéine SAG12 chez *Arabidopsis thaliana*. Le fonctionnement de l'anticorps sur *Brassica napus* L. a été validé au laboratoire (<http://www.agrisera.com/en/artiklar/sag12-sag12-protein.html>).

Pour le Western blot, 10 µg de protéines solubles ont été mis en présence de tampon Laemmli 2X (Laemmli, 1970 ; **Tableau C-2**) contenant 5% de β-mercaptoéthanol (v/v). Les échantillons ont ensuite été dénaturés en chauffant 5 min au bain marie (95°C). Les échantillons ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (Dual color Prestained, Bio-Rad) ont ensuite été séparés (10 min à 150V puis 20 min à 200V) par SDS-PAGE sur gel d'acrylamide pré-coulé de type « Stain-free »



Figure C-10 : Système de transfert semi-sec PierceG2 Fast Blotter (Thermo Scientific, Bremen, Allemagne) .

Tableau C-3 : Composition des tampons utilisés lors du transfert des protéines sur membrane PVDF.

Produits	Tampon Anode 1	Tampon Anode2	Tampon Cathode
Trizma-base	0,3 M	0,025 M	0,025 M
SDS	0,10%	0,10%	0,10%
Méthanol	35%	35%	20%
Glycine	-	-	0,04 M
pH	10,4	10,4	9,4

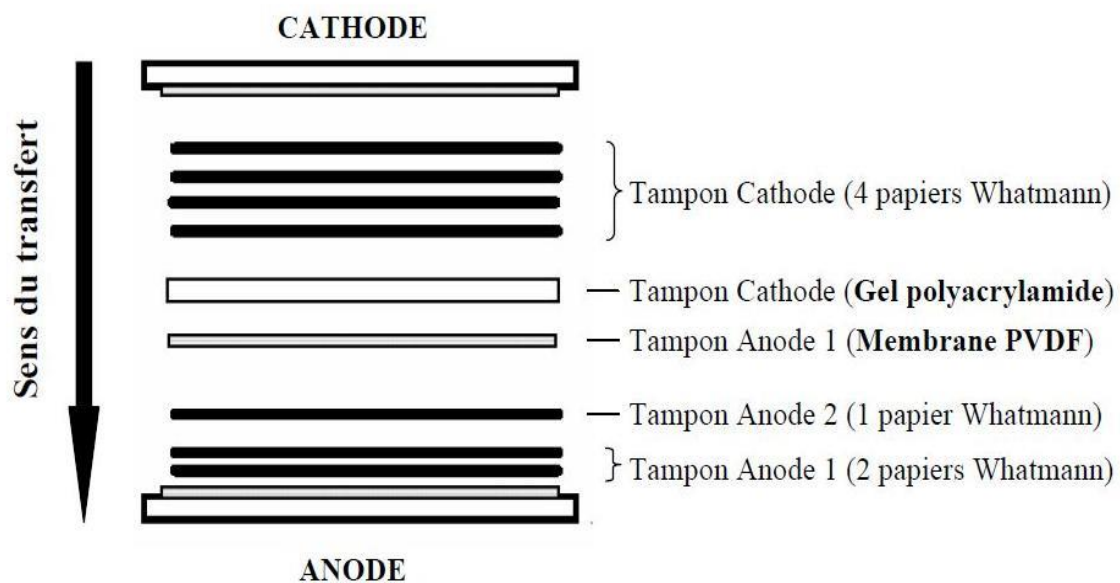


Figure C-11: Dispositif mis en place lors du transfert électrophorétique des protéines du gel de polyacrylamide vers la membrane de PVDF (Système PierceG2 Fast blotter).

(Mini-PROTEAN® TGXTM Stain Free, Bio-Rad). Le gel pré-coulé « Stain free » (**Figure C-9A**), correspond à un gel gradient de polyacrylamide (4-15%) contenant des composés trihalogénés. Ces molécules réagissent avec les résidus tryptophanes des protéines migrant dans le gel grâce à une réaction induite sous UV qui produit de la fluorescence. Le gel est directement démoulé, posé sur plaque (**Figure C-9B**) et révélé sous illumination UV grâce au scanner Gel Doc™ EZ muni du logiciel Image Lab™ (Bio-Rad) (**Figure C-9C**). Le scan du gel avant transfert sur membrane de PVDF permet d'estimer l'abondance de la grande sous-unité de la RuBisCO (RBCL, RuBisCO Large sub-unit) dans les échantillons afin de contrôler la qualité des dépôts.

Après séparation des protéines, le Western blot est effectué sur une membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF) via le système de transfert semi-sec PierceG2 Fast Blotter (Thermo Scientific, Bremen, Allemagne) (**Figure C-10**). Lors du transfert, trois tampons (Cathode, Anode 1, Anode 2) ont été utilisés et leurs compositions sont décrites dans le **Tableau C-3**. Le gel de polyacrylamide est équilibré pendant 20 min dans le tampon cathode sous agitation tandis que la membrane de PVDF est plongée dans du méthanol à 100% pendant 15 s puis 10 min dans l'eau ultrapure avant d'être équilibrée dans le tampon Anode 2 sous agitation. Des feuilles de papier Whatmann sont utilisées pour réaliser le « sandwich » de transfert comme décrit sur la **Figure C-11** et le transfert est réalisé en 10 min à 25V et 2.5 A/cm.

Après 3 lavages de 5 min dans du tampon TBST (Tris-base 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 à 0,15 % (v/v), pH 8), la membrane a été incubée 1h en présence de l'anticorps primaire de lapin anti-SAG12 (dilution 1/4000 dans du TBST contenant 5% de lait en poudre (p/v) afin d'éviter les hybridations non-spécifiques). Après 7 lavages de 5 min au TBST et 3 lavages de 5 min au TBS (Tris-base 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8), la membrane a été incubée 1h30 avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à la peroxydase de raifort (1/10000 dilué dans du TBST, Bio-Rad®). La peroxydase de raifort des anticorps secondaires est utilisée en conjonction avec un substrat dont le produit de réaction émet une luminescence proportionnelle à la concentration en protéines (kit de réaction de chemiluminescence ECL, Bio-Rad). La détection a été réalisée via le scanner ProXPRESS 2D proteomic Imaging System (PerkinElmer, Courtaboeuf) de la plateforme IMOGERE (Université de Caen Normandie).

C.IV.2 Etudes des activités protéolytiques

Afin d'éviter les dommages causés par des activités protéolytiques incontrôlées, les protéases sont fortement régulées dans la cellule. Il est donc difficile de prédire leur activité sur la seule base de l'abondance de la protéine ou des transcrits correspondant. C'est pour cela que l'activité des protéases a été directement étudiée par deux méthodes. La première méthode correspond à une étude de la dégradation de la RuBisCO *in vitro* en présence ou absence d'inhibiteurs de classes de protéases spécifiques. Cette méthode a permis la mise en évidence des principales classes de protéases impliquées dans la dégradation de la RuBisCO lors de la sénescence foliaire

8-12 μg de protéine solubles dans 200 μL de tampon sodium acétate (50 mM, pH 5.5)

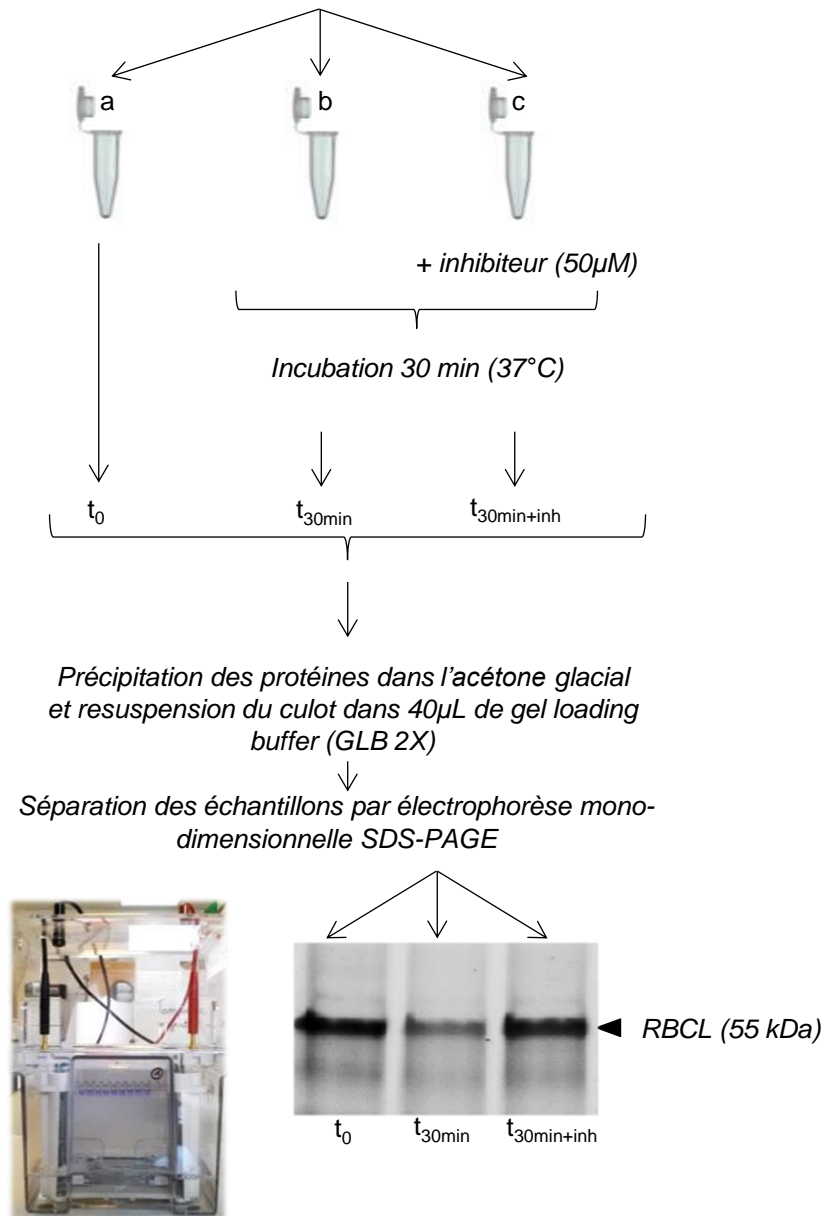


Figure C-12: Méthode utilisée pour mesurer la dégradation *in vitro* de la RuBisCO (grande sous unité: RBCL à 55 kDa) sur gel « stain-free » en présence ou absence d'inhibiteurs de classes de protéases spécifiques.

(Girondé *et al.*, 2015a). Même si cette méthode fournit des informations intéressantes, elle ne permet pas la quantification de l'activité totale des protéases ni l'identification spécifique de protéases actives. Pour cela, une deuxième technique complémentaire appelée ABPP pour « Activity-binding protein profiling » a été utilisée. Cette technique novatrice consiste en un marquage des protéases actives grâce à des sondes activité-dépendantes possédant un tag fluorescent ou biotine (Van der Hoorn *et al.*, 2012).

C.IV.2.a Dégradation in vitro de la RuBisCO sur gel « stain-free » en présence ou absence d'inhibiteurs de classes de protéases spécifiques

Les protéines solubles nécessaires à cette expérimentation ont été extraites grâce au protocole décrit précédemment au chapitre § C.IV.1.a.

Afin d'identifier les classes de protéases associées à la dégradation des protéines pendant la sénescence foliaire chez le colza, une analyse de la dégradation *in vitro* de la grande sous-unité de la RuBisCO (RBCL) a été réalisée en présence ou en absence d'inhibiteurs de classes de protéases spécifiques. Ce protocole a été focalisé sur la dégradation de la RuBisCO car cette protéine peut représenter plus de 50% des protéines de la feuille de colza (Desclos, 2008) et de ce fait elle est considérée comme une cible prioritaire des protéases pendant la sénescence.

Ce protocole a été modifié à partir de la méthode mise en point lors de mon stage de Master 2 en étroite collaboration avec Alexandra Girondé (Girondé *et al.*, 2015b) (Figure C-12).

Huit à 12 µg de protéines ont été incubés en présence de 200 µL de tampon sodium acétate (50 mM ; pH 5,5) en présence ou en absence de 50 µM de :

- E-64 (inhibiteur des papain-like cystein proteases (PLCPs)),
- Ac-YVAD-cmk (inhibiteur des vacuolar processing enzymes (VPEs)),
- Aprotinine (inhibiteur des protéases à sérine (SPs))
- Pepstatine A (inhibiteur des protéases à aspartate (APs)).

Un volume égal de diméthylsulfoxyde (DMSO) a été ajouté dans les tubes sans inhibiteur. Par ailleurs, lors de l'étude de l'activité des protéases à cystéine (PLCPs et VPEs), 2 mM de dithiothreitol (DTT) ont été ajoutés au tampon afin de rendre accessibles les sites actifs pouvant être partiellement bloqués par des ponts disulfures. Ces échantillons ont été incubés pendant 30 min à 37°C sous agitation.

En parallèle, 8 à 12 µg de protéines solubles ont été incubés en présence de 200 µL de tampon Tris-base (125 µM ; pH 7,5) en présence ou en absence de 50 µM d'époxomicine (inhibiteur du protéasome), d'aprotinine (inhibiteur des SPs) ou de pepstatine A (inhibiteur des APs). Un volume égal de DMSO a été ajouté dans les tubes sans inhibiteur. Les échantillons ont été incubés 90 min à 37°C sous agitation.

Tableau C-4 : Composition du tampon de charge (Gel loading buffer 2X)

<i>Gel loading buffer 2X</i>	
Sodium dodécyl sulfate (SDS)	140 mM
Tris-base	200 mM
Glycérol	20%
β -mercaptoéthanol	5%
Bleu de bromophénol	0,3 mM

Tableau C-5: Présentation des différentes classes de protéases étudiées ainsi que les inhibiteurs de ces protéases et les sondes associées pour les techniques de détection d'activités protéasiques sur gel.

<i>Classe de protéase</i>	<i>Sous-famille</i>	<i>Inhibiteur</i>	<i>Sonde avec un tag fluorescent</i>	<i>Sonde avec un tag biotine</i>	<i>Références</i>
Cys proteases	PLCPs (C1)	E-64	MV201	DCG04	Richau et al., 2012
	Aleurain-like protéases	E-64	FY01	-	Lu et al., 2015
	VPE (C14)	Ac-YVAD-cmk	JOPD1	-	Lu et al., 2015
Ser proteases	Subtilisins (S8), POPLs (S9), SCPLs (S10)	DFP or Aprotinin	FP-Rh	FP-biotin	Patricelli et al., 2001
Protéasome	T3	Epoxomicin	MVB072	-	Kolodziejek et al., 2011

La réaction a été stoppée par l'ajout de 1 mL d'acétone froid. Après 15 min à 4°C, les échantillons ont été centrifugés 15 min (16 000 *g* ; 4°C). Le culot obtenu a été repris dans 40 µL de tampon de charge 2X (**Tableau C-4**) et les échantillons ont été dénaturés à 90°C pendant 10 min.

Afin de déterminer la quantité initiale de RuBisCO par condition, un échantillon a été traité de la même façon mais la réaction a été stoppée immédiatement pour éviter la protéolyse.

Enfin, 20 µL de chaque échantillon ont été séparés sur gel gradient de polyacrylamide (4-15 %; Mini-PROTEAN® TGXTM Stain Free, Bio-Rad) comme décrit dans le § C.IV.1.b. La grande sous-unité de la RuBisCO (RBCL) a été quantifiée grâce au logiciel Image Lab™ après un scan effectué sur le système Gel Doc™ EZ (Bio-Rad).

Le pourcentage de dégradation de la RBCL a été calculé comme la différence de quantité entre l'échantillon incubé sans inhibiteur et l'échantillon non incubé :

$$\% \text{ dégradation RBCL} = 100 - [(100 * \text{RBCL}_{37^\circ\text{C}}) / \text{RBCL}_i]$$

avec $\text{RBCL}_{37^\circ\text{C}}$ = Quantité de RBCL après incubation à 37°C sans inhibiteur

et RBCL_i = Quantité initiale de RBCL dans l'échantillon non incubé

Le pourcentage d'inhibition de la dégradation de la RBCL provoqué par l'inhibiteur de protéase utilisé a été calculé comme la différence entre la quantité de RBCL dégradée dans l'échantillon incubé à 37°C sans inhibiteur et celui avec inhibiteur :

$$\% \text{ inhibition} = [((\text{DegRBCL}_{37^\circ\text{C}}) - (\text{DegRBCL}_{\text{inhib}})) * 100] / \text{DegRBCL}_{37^\circ\text{C}}$$

avec $\text{DegRBCL}_{37^\circ\text{C}} = \text{RBCL}_i - \text{RBCL}_{37^\circ\text{C}}$, $\text{DegRBCL}_{\text{inhib}} = \text{RBCL}_i - \text{RBCL}_{\text{inhib}}$

et $\text{RBCL}_{\text{inhib}}$ = Quantité de RBCL après incubation à 37°C avec inhibiteur

Différents pH d'incubation ont été utilisés afin de permettre aux différentes classes de protéases d'être actives à leur pH physiologique (dépendant de leur localisation sub-cellulaire). Par ailleurs, la RuBisCO étant une protéine présente dans les compartiments cellulaires acides (pH 5,5), les classes de protéases actives à pH 7,5 ne semblent pas physiologiquement être en présence de la RuBisCO dans la cellule. C'est pourquoi les analyses réalisées à pH 7,5 n'ont pas permis d'observer une dégradation significative de la RuBisCO via cette méthode *in vitro*.

C.IV.2.b Mesure des activités protéasiques via l'utilisation de sonde « activité-dépendantes »

Les spécificités des différentes sondes utilisées sont présentées dans le **Tableau C-5**. Chaque sonde correspond à une petite molécule composée de 2 parties essentielles (**Figure C-13A** ; exemple pour la sonde DCG04) :

- Un groupe réactif, spécifique d'une classe de protéase, souvent inspiré de la structure de l'inhibiteur spécifique de la classe de protéase. Ce groupe se fixe de façon covalente au site actif des protéases.

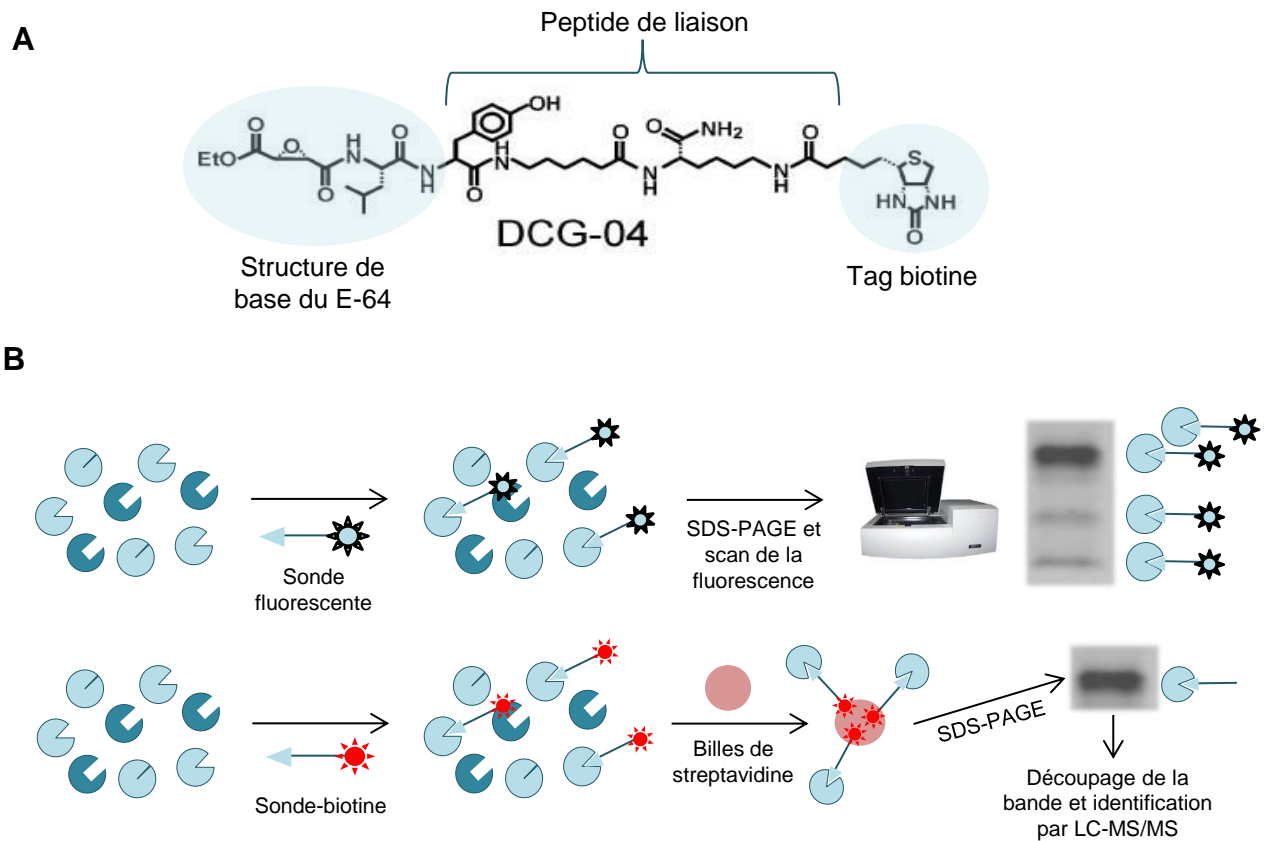


Figure C-13 : (A) Présentation de la structure d'une sonde (exemple DCG-04) et explication théorique du fonctionnement des sondes portant un tag fluorescent ou un tag biotine. (modifié d'après [Van der Hoorn et al., 2004](#)).

- Un tag, qui peut être fluorescent ou portant une biotine. Ce tag permet la détection, la purification et/ou l'identification des protéases marquées.

Le fonctionnement des sondes est expliqué sur la **Figure C-13B**. Ce fonctionnement repose sur le fait qu'une protéase dont le site actif est accessible correspond à une protéase en activité (Kobe et Kemp, 1999). De ce fait, la quantité de sites actifs accessibles à la sonde reflète l'activité des protéases à un temps donné.

C.IV.2.b.1 Détection des activités protéasiques via l'utilisation de sondes fluorescentes

Afin de tester ces techniques sur des extraits protéiques de feuille de colza, une collaboration avec le professeur Renier A. L. van der Hoorn (The Plant Chemetics Laboratory, Department of Plant Sciences » à l'université d'Oxford, Angleterre) a été mise en place. Grâce à un séjour d'un mois au sein du laboratoire d'Oxford. La technique a ensuite été mise au point au sein de notre laboratoire pour les expérimentations sur les feuilles cotylédonaire et les enveloppes de siliques. Pour cela, lors des deux prochains chapitres, il sera fait référence aux protocoles réalisés à Oxford et aux protocoles réalisés à Caen.

Afin d'extraire rapidement les protéines solubles et de minimiser les pertes d'activités des protéases, une nouvelle extraction des protéines solubles est réalisée. Pour cela, à 200 mg de matériel frais broyé a été ajouté 1 mL d'eau ultra-pure. Après centrifugation (5 min; 13 000 *g* ; 4°C), le surnageant contenant les protéines solubles est prélevé et la concentration en protéines a été déterminée par un dosage colorimétrique en microplaque selon la méthode de Bradford (1976) décrite au chapitre § C.IV.1.a.

Le marquage des protéases actives avec les sondes a été réalisé en incubant 20 μ L d'extrait protéique en présence d'un mélange réactionnel de 200 μ L (volume final) contenant :

- Dans le cas de l'étude des protéases actives à pH 5,5 (PLCPs, VPEs, Aleurain-like protéases) : 0,5 μ M de sonde (MV201, FY01 ou JOPD1), 50 mM de tampon sodium acétate à pH 5,5 et 2 mM DTT. Les échantillons ont été incubés 4h à température ambiante, sous agitation et à l'abri de la lumière.
- Dans le cas de l'étude des protéases actives à pH 7,5 (SPs et le protéasome) : 0,5 μ M de sonde MVB072 ou 0,25 μ M de sonde FP-Rh. Les échantillons ont été incubés 1h à température ambiante, sous agitation et à l'abri de la lumière.

En parallèle, deux mélanges correspondant à regroupement des échantillons protéiques issus des répétitions biologiques des traitements HN ou LN ont été réalisés pour effectuer les contrôles. Pour cela, 20 μ L de chaque mix ont été traités comme décrit précédemment, un autre échantillon a reçu le même volume de DMSO en remplacement de la sonde afin de démontrer que sans la sonde aucun signal fluorescent n'était perceptible sur le gel (NPC, No probe control).

Tableau C-6: Composition du gel d'acrylamide utilisé pour la séparation des protéases en SDS-PAGE

<i>Produits</i>	<i>gel de séparation</i>	<i>gel de concentration</i>
% d'acrylamide	12	6
Eau ultra-pure	23,1 mL	19,6 mL
30 % Acrylamide	28 mL	6 mL
1,5 M Tris (pH 8.8)	17,5 mL	-
1,0 M Tris (pH 6.8)	-	3,78 mL
10 % SDS (sodium dodécyl sulfate)	0,7 mL	0,3 mL
10 % APS (Ammonium persulfate)	0,7 mL	0,3 mL
TEMED	0,028 mL	0,030 mL

Enfin, une expérience de compétition a été réalisée afin de démontrer qu'aucun signal fluorescent n'est perceptible sur le gel si l'activité des protéases a été préalablement inhibée par la présence d'un inhibiteur (sonde activité-dépendante). Pour cela les échantillons ont été prétraités 30 min avec 50 μ M de E-64 (inhibiteur des PLCPs et Aleurain-like protéases), de Ac-YVAD-cmk (inhibiteur des VPEs), d'époxomicine (inhibiteur du protéasome) ou de diisopropylfluorophosphate (DFP) avant l'ajout des sondes respectives. La réaction a été stoppée par un ajout de 1 mL d'acétone froid. Après 15 min à 4°C, les échantillons ont été centrifugés 15 min (16 000 *g* ; 4°C). Le culot obtenu a été repris dans 40 μ L de tampon de charge 2X (**Tableau C-4**) et les échantillons ont été dénaturés à 90°C pendant 10 min.

Les échantillons ont ensuite été séparés par SDS-PAGE sur gel à 12% d'acrylamide dont la composition est décrite dans le **Tableau C-6** (10 min 150 V suivi de 60 min à 200 V). La fluorescence des protéines marquées a été visualisée en scannant le gel sur le système Typhoon 9400 (GE Healthcare Life Science) pour les expériences réalisées à Oxford ou ProXPRESS 2D proteomic Imaging System (PerkinElmer) pour les expériences réalisées au sein du laboratoire. Les longueurs d'excitation et d'émission utilisées ont été respectivement de 532 et 580 nm. Enfin, les signaux fluorescents ont été quantifiés par le logiciel ImageJ ®.

Les gels ont ensuite été colorés toute la nuit au bleu de coomassie (0,5 g de coomassie brillant blue G250, 10% d'acide acétique, 45% de méthanol dans de l'eau ultra-pure), décolorés 1 h dans un tampon décolorant (10% d'acide acétique et 40% de méthanol dans de l'eau ultra-pure) et scannés par les mêmes équipements décrits dans le paragraphe précédent afin de contrôler la quantité de protéines déposée sur les gels.

Enfin, l'intensité du signal fluorescent a été utilisée pour déterminer l'activité spécifique des protéases (exprimée par mg de protéines). Par la suite, pour les analyses protéomiques réalisées à l'aide de ces sondes dans le cadre des travaux sur cotylédons ou péricarpes, les protéines ont été déposées sur les gels en quantités équivalentes et non plus à volumes équivalents. Ceci a permis de diminuer l'erreur pouvant être provoquée par les imprécisions associées aux calculs de l'activité spécifique (intensité de fluorescence par mg de protéines).

En résumé, cette technique a permis de:

- Quantifier l'activité protéasique totale des PLCPs, des VPEs, des Aleurain-like protéases, des SPs et du protéasome à pH acide ou basique
- Visualiser le poids moléculaire des protéases actives
- Visualiser l'augmentation d'une ou plusieurs activités ou encore l'apparition de nouvelles activités protéasiques lors du processus de sénescence

Par ailleurs, afin d'identifier les protéases actives responsables de ces signaux fluorescents, une autre technique a été utilisée (cf § C.IV.2.b.2).

Tableau C-7: Composition du tampon phosphate salin (phosphate buffer saline ou PBS 1X)

<i>Tampon PBS 1X</i>	
Eau ultra-pure	1L
Chlorure de sodium NaCl	8 g
Chlorure de potassium KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g

Ajuster le pH à 7,4 avec de l'acide chlorhydrique

C.IV.2.b.2 Purification et identification des protéases actives via l'utilisation de sonde « activité-dépendantes » couplées à un résidu biotine

Afin d'identifier les protéases actives, un marquage des protéases a été réalisé grâce à des sondes « activité-dépendantes » possédant un tag biotine suivi d'une purification des protéines biotinylées appelée « pool-down » comme décrit par [Chandrasekar et al. \(2014\)](#).

Afin de réaliser le marquage des protéases actives avec les sondes, 700 à 900 µg de protéines solubles ont été incubés en présence d'un mélange réactionnel de 1 mL final contenant:

- Dans le cas de l'étude des protéases actives à pH 5,5 (PLCPs) : 5 µM de sonde DCG04, 50 mM de tampon sodium acétate (pH 5,5) et 2 mM DTT. Les échantillons ont été incubés 4h à température ambiante sous agitation.
- Dans le cas de l'étude des protéases actives à pH 7,5 (SPs) : 5 µM de sonde FP-biotin, 50 mM de tampon tris (pH 7,5). Les échantillons ont été incubés 1h à température ambiante sous agitation.

En parallèle, un autre échantillon protéique a été traité comme décrit précédemment mais en l'absence de sonde pour servir de contrôle et permettre de visualiser et d'éliminer les faux positifs correspondant aux protéines possédant naturellement un résidu biotine.

A la fin de l'incubation, la réaction est stoppée par précipitation au chloroforme/méthanol glacial (1V de CHCl₃ / 4V de méthanol / 3V d'eau ultrapure). Lorsque le précipité protéique est formé, l'échantillon est centrifugé 30 min à 4°C (4000 g). A la fin de la centrifugation, la phase protéique formée entre la phase méthanolique et la phase chloroformique est récupérée, reprise dans 2 mL de tampon PBS (Phosphate buffer salin 1X ; **Tableau C-7**) contenant 1,2% (p/v) de SDS (sodium dodécyl sulfate) et chauffée 10 min à 95°C. Pendant l'incubation des échantillons à 95°C, les billes d'agarose-streptavidine ont été pré-équilibrées. Pour cela, 100 µL de billes ont été mélangées avec 1 mL de tampon PBS contenant 0,2% (p/v) de SDS et centrifugés 3 min à 1400 g. Cette étape a été répétée 3 fois.

Après pré-équilibration des billes d'agarose-streptavidine, les échantillons ont été repris dans 10 mL de tampon PBS 1X (**Tableau C-7**) et les billes ont été ajoutées à l'échantillon. La capture des protéases ayant fixé la sonde-biotine sur les billes d'agarose-streptavidine est réalisée pendant une incubation d'une heure à température ambiante sous agitation. Après centrifugation (3 min; 1400 g), le surnageant est éliminé et le culot contenant les billes subit plusieurs lavages consécutifs : 3 fois en présence de 5 mL de tampon PBS à 1,2% de SDS, 3 fois en présence de 5 mL de tampon PBS à 1% de SDS, 3 fois en présence de 5 mL de tampon PBS 1X et une fois en présence de 10 mL d'eau ultra-pure. A la fin de chaque lavage, l'échantillon a été centrifugé (3min à 1400 g) et le surnageant est éliminé. A la fin du dernier lavage, 1 mL d'eau ultra-pure contenant les billes a été transféré dans un nouveau microtube de 1,5 mL, centrifugé

(3 min à 1400 *g*) et le surnageant a été éliminé. Enfin, le culot a été repris dans 30 μ L de tampon GLB 4X (concentration doublée par rapport au **Tableau C-4**) et chauffé à 95°C pendant 15 min. Cette étape permet de décrocher les protéases des billes d'agarose. Après centrifugation 1min à 16000 *g*, le surnageant est déposé sur gel d'acrylamide 12%. L'électrophorèse SDS-PAGE monodimensionnelle a été réalisée comme décrit précédemment au § C.IV.2.b.1.

Les méthodes de révélation du gel et d'analyses LC-MS/MS des protéines ont été différentes entre l'article 1 réalisé à Oxford et les articles 2 et 3 réalisés au laboratoire EVA et sont donc décrites séparément.

- Méthodes de révélation du gel et d'analyses LS-MS/MS utilisées à Oxford:

Une fois la migration terminée, le gel a été coloré toute la nuit au SYPRO Ruby (LifeTechnologies) et décoloré en présence d'un tampon contenant 10% de méthanol et 1% d'acide acétique. Les protéines ont enfin été détectées via un scanner ImageQuant LAS 4000 (Filter Y515 Long Pass 500-520 nm; GE Healthcare Life Sciences) après excitation à 460 nm. Les bandes ont ensuite été découpées et la digestion trypsique a été réalisée selon le protocole de [Kaschani et al. \(2012\)](#).

Les morceaux de gel ont été lavés avec 500 μ L d'eau ultra-pure pendant 15 min sous agitation. Après centrifugation (10 s ; 16000 *g*), les morceaux de gels ont été mis en présence de 500 μ L d'ammonium bicarbonate (100 mM) pendant 15 min et recentrifugés (10 s ; 16000 *g*) afin d'éliminer le surnageant. Les échantillons ont ensuite été incubés 30 min à 62°C en présence de Tris-(2-Carboxyethyl)phosphine, Hydrochloride (TCEP). Après centrifugation (10 s ; 16000 *g*), 200 μ L d'IAA (iodoacétamide, 55mM) ont été ajoutés, les échantillons ont été incubés 30 min à température ambiante sous agitation, à l'abri de la lumière et le surnageant a été éliminé après centrifugation (10 s ; 16000 *g*). Les morceaux de gel ont ensuite été lavés trois fois en présence de 500 μ L d'un mélange d'acétonitrile (ACN) et de bicarbonate d'ammonium (100 mM) (50 : 50 (v/v)) et centrifugés afin d'éliminer le surnageant. Après ajout de 50 μ L d'ACN 100%, les pièces de gel ont été séchées au concentrateur afin d'éliminer l'ACN restant. Dans chaque échantillon, 20 μ L de solution de trypsine à 10 ng/ μ L sont apportés et après 10 minutes les morceaux de gel ont été totalement recouverts avec du bicarbonate d'ammonium (25 mM). La digestion a duré toute la nuit sous agitation à 37°C puis le surnageant contenant les peptides a été récupéré. Le reste des morceaux de gel a été mis en présence de 200 μ L d'acide formique à 5% pendant 15 min à température ambiante. Après centrifugation, le surnageant a été ajouté au premier surnageant. Enfin, le reste des gels a été lavé 3 fois de suite avec de l'ACN 100% pendant 15 min à température ambiante. A chaque fois le surnageant a été ajouté au précédent. Finalement, le surnageant final contenant les peptides a été séché au speedVac pendant 5 h à 30°C afin

Tableau C-8: Méthode de coloration des protéines au nitrate d'argent (Blum *et al.*, 1987)

<i>Etapes</i>	<i>Solutions de traitement</i>	<i>Durée de traitement</i>
Fixation	Méthanol 50% (v/v), acide acétique glacial 12% (v/v), 0,5 µg/mL formaldéhyde 37%	1 heure au minimum
Lavages	Ethanol 50% (v/v)	3 fois 2 minutes
Pré-traitement	0,2 mg/mL Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	1 minute
Lavages	Eau ultra pure	3 fois 20 secondes
Imprégnation	2 mg/mL AgNO ₃ , 0,75 µg/mL formaldéhyde 37%	20 minutes
Lavages	Eau ultra pure	3 fois 20 secondes
Révélation	60 mg/mL Na ₂ CO ₃ , 4µL/mL Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O 0,5 µg/mL formaldéhyde 37%	2 minutes environ
Lavages	Eau ultra pure	3 fois 30 secondes
Arrêt	Méthanol 50% (v/v), acide acétique glacial 12% (v/v)	10-20 minutes
Lavages	Eau ultra pure	3 fois 30 secondes

d'atteindre un volume final approchant les 10 µL. Les peptides obtenus ont ensuite été dessalés via l'utilisation de Tips C8 (Thermo scientific, Bremen, Germany).

Enfin les peptides ont été analysés en triplicat par nano-LC-MS/MS (chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse) via l'utilisation d'un nano-Acquity-UPLC (colonne C18 de 75 µm × 250 mm, 1,7 µm taille des particules; Waters) couplé à un spectromètre de masse Orbitrap Elite (Thermo Scientific) par la plateforme de protéomique de l'université d'Oxford. Pour cela, un gradient linéaire de 60 min (3 à 40% d'acétonitrile dans 0,1% d'acide formique) a été programmé à un débit de 250 nL.min⁻¹. Les données MS ont été analysées via l'utilisation de l'outil informatique MASCOT (<http://matrixscience.com>). Les listes des pics sur les spectres MS/MS ont été extraites et comparées aux bases de données *Brassica napus* 20150610 (101040 séquences; 33618840 résidus). Chaque protéine de *Brassica napus* identifiée a été présentée avec son numéro d'accession GenBank ainsi que son score, le nombre de peptides reconnus, sa masse théorique et expérimentale. De plus, la séquence de chaque protéine a été comparée aux séquences de protéines de Brassicacées de la base de données NCBI Blast Protein (algorithm blastp) et les meilleurs résultats ont été présentés avec le pourcentage d'identité obtenu entre les protéines. Ces comparaisons ont permis d'affecter certaines fonctions putatives aux protéines de colza sur la base de leur identité avec des protéines connues chez d'autres Brassicacées comme *Arabidopsis thaliana* ou *Brassica oleracea*.

- Méthodes de révélation du gel et d'analyses LS-MS/MS mise au point au laboratoire EVA à Caen :

Une fois la migration terminée, les gels ont été colorés au nitrate d'argent en suivant la méthode décrite dans le **Tableau C-8** (Blum *et al.*, 1987). Les bandes ont été coupées manuellement et l'identification des protéines a été réalisée par la plate-forme de Protéomique PISSARO de l'IFR MP 23 à l'université de Rouen. Les morceaux de gels ont été réduits à 50°C pendant 1 h en présence de 10 mM de DTT et alkylés pendant 1h à l'obscurité avec 55 mM d'IAA. Les fragments de gel ont été lavés plusieurs fois avec de l'eau et du carbonate d'ammonium, déshydratés en présence d'ACN et séchés. La digestion trypsique a duré toute la nuit grâce à un système automatique dédié (MultiPROBE II, PerkinElmer). Les morceaux de gel ont été incubés 2 fois pendant 15 min dans une solution d'ACN pour extraire les peptides du gel. Les extraits peptidiques ont ensuite été séchés puis dissouts dans un tampon contenant 3% acétonitrile et 0,1% acide formique dans de l'eau pour l'élution en chromatographie. Les peptides ont été enrichis, séparés et analysés par un spectromètre de masse 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS équipé d'une interface HPLC (Agilent Technologies, Massy, France). Les données de fragmentation ont été interprétées via le logiciel Mass Hunter (version B.03.01, Agilent Technologies). Pour l'identification des protéines, les pics MS/MS ont été convertis sous format

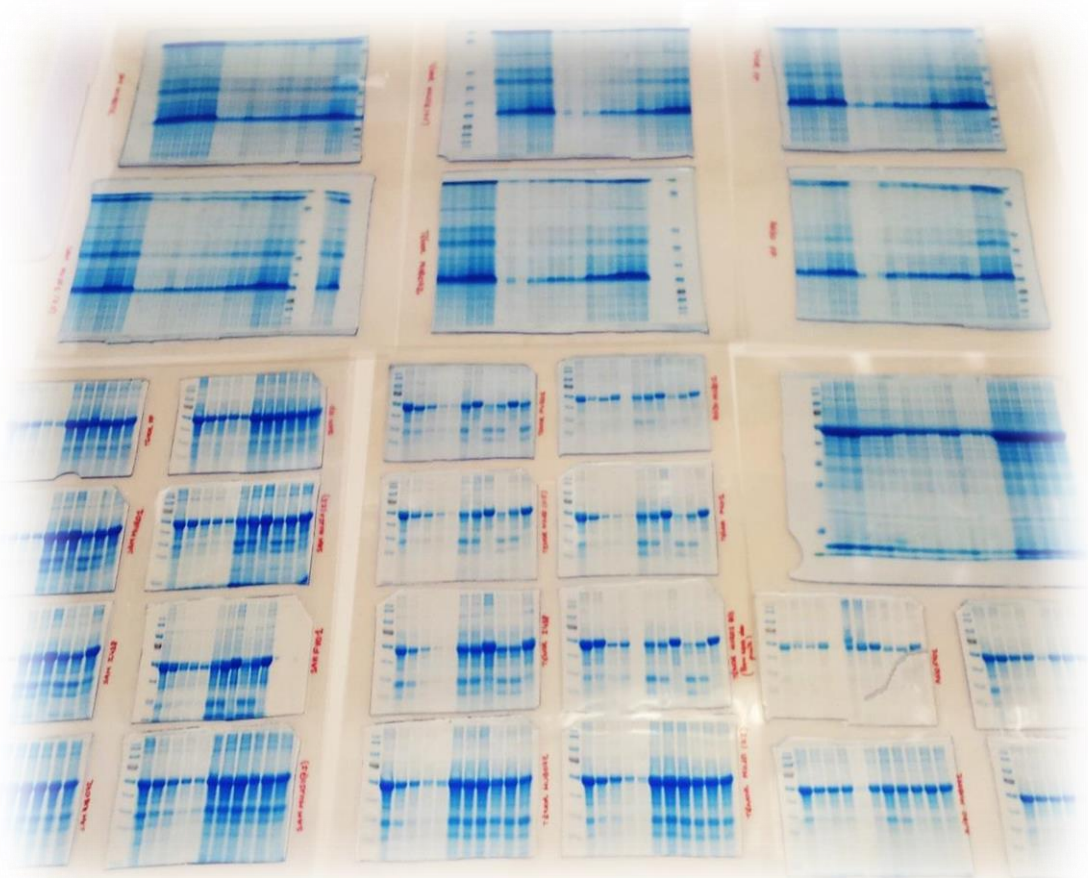
mzdata.xml et comparés à la base de données NCBI Inr-Viridiplantae via le logiciel MASCOT Daemon search (version 2.1.3; Matrix Science, London, UK). Les données MS/MS ont été comparées avec une tolérance de masse de 20 ppm pour les ions précurseurs et 0,6 Da pour les fragments. Au moins 2 peptides présentant un score $>$ à 48, définis par MASCOT, sont requis pour considérer l'identification positive. De façon similaire à la technique utilisée à Oxford, chaque protéine de *Brassica napus* identifiée a été présentée avec son numéro d'accèsion GenBank ainsi que son score, le nombre de peptides reconnus, sa masse théorique et expérimentale. De plus, la séquence de chaque protéine a été comparée aux séquences de protéines de Brassicacées de la base de données NCBI Blast Protein (algorithm blastp) et les meilleurs résultats ont été présentés avec le pourcentage d'identité obtenu entre les deux protéines. Ces comparaisons ont permis d'affecter certaines fonctions aux protéines de colza sur la base de leur identité avec des protéines connues chez d'autres Brassicacées comme *Brassica Rapa* ou *Brassica oleracea*.

C.V. Méthodes d'analyses statistiques

Pour chaque mesure, 3 répétitions biologiques ont été analysées (n=3). Toutes les données présentées sont exprimées par la moyenne \pm l'erreur standard (SE) (**article 1**) ou l'écart-type (**articles 2, 3 et 4**). La normalité des données a été vérifiée avec le test de Ryan-Joiner à 95%. Les analyses de variance (ANOVA) et les tests Newman-Keuls ont été utilisés pour comparer les moyennes via l'utilisation du logiciel Microsoft® Excel 2010/XLStat® 2014 et 2016. Lorsque les données ne suivaient pas une loi normale, le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé. La significativité des tests a été fixée à $P < 0,05$.

Chapitre D

Résultats



Chapitre D : Résultats

Chapitre D.I. Caractérisation de l'activité des protéases associées à une dégradation efficiente des protéines pendant la sénescence foliaire chez le colza d'hiver

Contexte : Le colza (*Brassica napus* L.) est une plante de grande culture caractérisée par une faible Efficience d'Usage de l'Azote (EUA). Cette EUA médiocre est principalement liée à une faible Efficience de Remobilisation de l'Azote (ERA) durant la sénescence foliaire de type séquentielle qui se manifeste aux stades végétatifs. De plus, de récents travaux ont démontré qu'une forte remobilisation du N est associée à une dégradation efficace des protéines lors de la sénescence foliaire (Girondé *et al.*, 2015a).

Objectif : Afin d'optimiser l'ERA dans le but d'améliorer *in fine* l'EUA chez le colza, l'objectif de ces travaux était de caractériser les activités protéasiques impliquées dans les mécanismes de protéolyse associés à la sénescence foliaire séquentielle.

Démarche expérimentale : Les perturbations physiologiques et les activités protéasiques associés à la sénescence foliaire de type séquentielle ont été étudiées en cinétique, au sein d'une feuille mature entrant en sénescence sur des plantes de colza cultivées en serre et soumises à une alimentation non limitée ou limitée en nitrate. Les activités protéasiques ont été étudiées *via* l'analyse de la dégradation *in vitro* de la RuBisCO en présence ou en absence d'inhibiteurs de classes de protéases spécifiques et également *via* l'utilisation de sondes « activité-dépendantes » permettant à la fois de quantifier l'activité protéasique et d'identifier les protéases associées.

Résultats : Il a été démontré premièrement qu'une limitation en N accélère et exacerbe les changements physiologiques associés à la sénescence (induction de remobilisation du N, chute du niveau de chlorophylles...). Par ailleurs, plusieurs classes de protéases sont impliquées dans la dégradation des protéines associée à la sénescence foliaire (naturelle ou induite par une limitation en N) au stade rosette. En effet, les protéases à aspartate ainsi que le protéasome sont actifs pendant la sénescence quel que soit le traitement. Par ailleurs, les activités des protéases à sérine et à cystéine ont fortement augmenté pendant la sénescence foliaire particulièrement lors d'une limitation en N aboutissant à une dégradation plus importante des protéines solubles. Plusieurs protéases à sérine et à cystéine à l'origine de ces fortes activités ont été purifiées et identifiées par LC-MS/MS.

Ces résultats ont permis la mise en évidence des principales classes de protéases associées à la sénescence foliaire naturelle ou induite par une limitation en N chez le colza.

Néanmoins, comme la dégradation des protéines solubles pendant la sénescence semble fortement corrélée à l'ERA chez le colza, des activités protéasiques différentes ou de différentes intensités pourraient être à l'origine des différences génotypiques d'ERA observées lors d'une limitation en N chez le colza au stade rosette (Girondé *et al.*, 2015a). Cette hypothèse sera étudiée dans le chapitre §D.III. De plus, une deuxième interrogation découle de ces travaux : ces protéases sont-elles identiques et/ou avec une activité similaire lors de la remobilisation du N durant la sénescence des siliques correspondant à une étape cruciale du remplissage de la graine? Cette question sera traitée dans le chapitre §D.II.

D.I. Characterization of senescence-associated protease activities involved in the efficient protein remobilization during leaf senescence of winter oilseed rape

Marine Poret^{1, 2, 3}, Balakumaran Chandrasekar^{4, 5}, Renier A. L. van der Hoorn⁴, Jean-Christophe Avice^{1, 2, 3*}.

¹ Université de Caen Normandie, F-14032 Caen, France

² UCBN, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France, F-14032 Caen, France

³ INRA, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France

⁴ The Plant Chemetics Laboratory, Department of Plant Sciences, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3RB, United Kingdom

⁵ The Plant Chemetics Laboratory, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Carl-von-Linne Weg 10, 50829 Cologne, Germany

Running title: Protease activities in rapeseed senescing leaves

Abstract

Oilseed rape (*Brassica napus* L.) is a crop plant characterized by a poor nitrogen (N) use efficiency that is mainly due to low N remobilization efficiency during the sequential leaf senescence of the vegetative stage. As a high leaf N remobilization efficiency was strongly linked to a high remobilization of proteins during leaf senescence of rapeseed, our objective was to identify senescence-associated protease activities implicated in the protein degradation. To reach this goal, leaf senescence processes and protease activities were investigated in a mature leaf becoming senescent in plants subjected to ample or low nitrate supply. The characterization of protease activities was performed by using *in vitro* analysis of RuBisCO degradation with or without inhibitors of specific protease classes followed by a protease activity profiling using activity-dependent probes. As expected, the mature leaf became senescent regardless of the nitrate treatment, and nitrate limitation enhanced the senescence processes associated with an enhanced degradation of soluble proteins. The characterization of protease activities revealed that: (i) aspartic proteases and the proteasome were active during senescence regardless of nitrate supply, and (ii) the activities of serine proteases and particularly cysteine proteases (Papain-like Cys proteases and vacuolar processing enzymes) increased when protein remobilization associated with senescence was accelerated by nitrate limitation.

Short statement: Serine and particularly cysteine proteases (both PLCPs and VPEs) seem to play a crucial role in the efficient protein remobilization when leaf senescence of oilseed rape was accelerated by nitrate limitation.

Keywords: *Brassica napus*, nitrogen remobilization efficiency, soluble proteins, protease activity, senescence-associated proteases, cysteine proteases.

Abbreviations: AP, aspartic protease; CCV chloroplast vesiculation-containing vesicle; CP, cysteine protease; CXE, carboxylesterase; HN, high nitrate; LN, low nitrate; MES, methylesterase; N, nitrogen; NPC, no probe control; NRE, nitrogen remobilization efficiency; NUE, nitrogen use efficiency; PLCP, papain-like cysteine protease; POPL, prolyloligopeptidase-like protease; RuBisCO (RBC), ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase; RBCL, large subunit of RuBisCO; SAP, senescence associated protease; SAV, senescence associated vesicles; SCPL, serine carboxypeptidase-like protein; SP; serine protease; VPE, vacuolar processing enzyme.

D.I.1 Introduction

Oilseed rape (*Brassica napus* L.) is the third largest oleaginous crop worldwide and the dominant oilseed crop in northern Europe. It is cultivated for its seeds, from which the extracted oil is used for human food and non-food uses (biofuel, detergents and lubricants) and the cake leftover from processing, which is rich in proteins and micronutrients, is used for animal feed. However, oilseed rape needs a large amount of nitrogen (N) fertilizers (160-250 kg N ha⁻¹ year⁻¹) for its development (Rathke *et al.*, 2005), which can lead to economic losses as well as negative impacts on the environment, and so N fertilization represents the main operational cost for farmers. That is why, in a context of sustainable agriculture, a reduction in N inputs combined with the optimization of oilseed rape Nitrogen Use Efficiency (NUE) has become essential (Behrens *et al.*, 2001; Avice and Etienne, 2014). Oilseed rape is characterized by a low NUE because only 50% of the N from fertilizers is finally recovered in the seeds, while a significant proportion of N inputs is returned to the environment directly or by the fallen leaves (Schjoerring *et al.*, 1995). Moreover, it was shown that the low NUE is mainly due to a weak N Remobilization Efficiency (NRE) (Malagoli *et al.*, 2005a-b; Gombert *et al.*, 2006). Indeed, during the vegetative stages of growth the recycling of foliar N is not optimal during the 'sequential' leaf senescence, which corresponds to a senescence progression along the axis of the plant that affects leaves as they reach maturity and leads to nutrient remobilization from the older leaves to the younger leaves (Avice and Etienne, 2014).

In plants, senescence corresponds to the final stage of leaf development and is characterized by the transition from assimilation to remobilization of nutrients (Masclaux *et al.*, 2000). This phenomenon contributes to resource management, recycling and nutrient remobilization efficiency (Guiboileau *et al.*, 2010) and is essential for plant productivity (Noquet *et al.*, 2004; Gregersen *et al.*, 2013). Leaf senescence, controlled by intrinsic and environmental factors, leads to a sequence of events such as chlorophyll loss, degradation of macromolecules like proteins, dismantling of cellular components, and cell death (Jing *et al.*, 2012; Krupinska *et al.*, 2012; Avice and Etienne, 2014). Considered as the most important degradation process during leaf senescence, protein breakdown allows the remobilization of N (Diaz *et al.*, 2008) and the

resulting amino acids or peptides are exported to growing parts of the plant *via* the phloem, leading to an increase in the concentration of amino acids in the phloem sap (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006; Herrera-Rodriguez *et al.*, 2007).

A recent study has shown that the enhancement of amino acid export and soluble protein degradation in senescing leaves of oilseed rape are crucial for the improvement of N remobilization (Girondé *et al.*, 2015a). This study on the genotypic variability of foliar N remobilization at the vegetative stage of *Brassica napus* L. revealed that, for the ten genotypes, the export of amino acids is efficient for the ten genotypes studied. Otherwise, the genotype Aviso, unlike other genotypes, is able to maintain its leaf biomass production in response to low nitrate supply and this was essentially due to an improvement of soluble protein degradation. Up to 75% of leaf N is located in chloroplasts as proteins, especially in RuBisCO (ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase, EC 4.1.1.39) and LHCII (Light Harvesting complex II) (Hörtensteiner *et al.*, 2002; Feller *et al.*, 2008) located in the stroma or in the thylakoid membrane, respectively. Moreover, it is known that the RuBisCO degradation during senescence provides much of N needed to the development of growing organs (Demirevska-Kepova *et al.*, 2005; Thoenen *et al.*, 2007). Accordingly, the improvement of RuBisCO recycling by proteases is crucial for the optimization of N remobilization (Feller *et al.*, 2008). Surprisingly, in fallen leaves of *Brassica napus* L., RuBisCO corresponds to one of the major residual proteins (Desclos-Théveniau *et al.*, 2014), suggesting that proteolysis is limiting for N remobilization during sequential senescence in leaves of oilseed rape.

There are many protease classes involved in protein breakdown during senescence including serine, aspartic, metallo- and cysteine proteases and the proteasome (Roberts *et al.*, 2012). In wheat, several serine proteases are induced in response to N starvation during leaf senescence (Roberts *et al.*, 2006). Moreover, N starvation in oilseed rape plants leads to an increase in an aspartic protease during the first phases of leaf senescence (Desclos *et al.*, 2009). Furthermore, aspartic protease CND41 participates in RuBisCO degradation during senescence and *CND41* antisense tobacco presented a delay in the senescence process and an accumulation of N in senescent leaves (Kato *et al.*, 2004, 2005). Metalloproteases have also been implicated in senescence and several genes encoding metalloproteases, particularly FtsH proteases, are induced in senescent leaves of *Arabidopsis thaliana* (Guo *et al.*, 2004). Using proteomics, Desclos *et al.* (2009) showed that nitrate limitation induces a chloroplastic FtsH in senescent leaves of oilseed rape (cv. Capitol). Cysteine proteases might be crucial for the degradation of proteins as they are the most abundant class of proteases up-regulated during leaf senescence-related proteolysis (Bhalerao *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2004). Indeed, in senescent leaves of *Arabidopsis thaliana*, a high cysteine protease activity was detected in Senescence Associated Vesicles (SAV) (Otegui *et al.*, 2005) and several experiments have demonstrated a role for this class of

Table D.I-1: Different classes of proteases studied in this work, their specific inhibitors and activity-based probes. The codification of the probes and the corresponding references for the synthesis of these probes are listed.

Class of protease	Sub-family	Inhibitor	Probe with fluorescent tag	Probe with biotin tag	References for the probes
Cys proteases	PLCPs (C1)	E-64	MV201	DCG04	Richau <i>et al.</i>, 2012
Ser proteases	VPE (C14)	Ac-YVAD-cmk	JOPD1	-	Lu <i>et al.</i>, 2015
	Subtilisins (S8), POPLs (S9), SCPLs (S10)	DFP or Aprotinin	FP-Rh	FP-biotin	Patricelli <i>et al.</i>, 2001
Proteasome	T3	Epoxomicin	MVB072	-	Kolodziejek <i>et al.</i>, 2011
Asp proteases	-	Pepstatin A	-	-	-

proteases in RuBisCO degradation (Prins *et al.*, 2008; Thoenen *et al.*, 2007). Some studies implicated Vacuolar Processing Enzymes (VPEs, a sub-family of cysteine proteases) in leaf senescence. As demonstrated by Sanmartín *et al.* (2005), α VPEs and γ VPEs were up-regulated in senescing vegetative organs of *Arabidopsis thaliana* and encoded proteins might be responsible for the activation of downstream proteases involved in the recycling of amino acids during senescence (Rojo *et al.*, 2003). Finally, the ubiquitin-proteasome system is also implicated in protein degradation during senescence. The proteasome is able to degrade ubiquitinated, short-lived, regulatory or abnormal proteins. The proteasome consists of the 19S regulatory particle and the 20S core protease. The 20S core protease contains the catalytic subunits β 1 (caspase-like activity), β 2 (trypsin-like activity) and β 5 (chymotrypsin-like activity) (Gu *et al.*, 2010). Proteomic analysis revealed that the catalytic β 1 subunit was induced during leaf senescence in oilseed rape (Desclos *et al.*, 2009; Avice and Etienne, 2014).

While RuBisCO degradation during senescence is relatively well studied in other plant species (Kato *et al.*, 2001; 2004; Feller *et al.*, 2008), this process remains largely unknown in oilseed rape. Because soluble protein degradation in senescing leaves of oilseed rape is crucial for the improvement of leaf N remobilization, the characterization of protease activities is key for comprehension of N remobilization. Thus, our objective was to identify senescence-associated protease activities implicated in protein remobilization during leaf senescence at the vegetative stage.

As proteases are tightly regulated to prevent damage by uncontrolled proteolytic activities, it is difficult to predict the activity of proteases on the basis of their transcript or protein abundance alone. That is why we focused this work on detecting protease activities by performing an *in vitro* analysis of the degradation of the RuBisCO large subunit (RBCL), with or without inhibitors of specific protease classes. Additionally, to identify the active proteases associated with the efficient leaf protein degradation during leaf senescence, we used activity-based protein profiling, an original method which allows the detection and identification of proteases in their active states (van der Hoorn and Kaiser, 2012).

D.I.2 Materials and methods

D.I.2. a Chemicals

E-64, epoxomicin, Ac-YVAD-cmk, diisopropylfluorophosphate (DFP), aprotinin and pepstatin A were from SIGMA-ALDRICH®. The probes MV201, JOPD1, MVB072, FP-Rh, DCG-04 and FP-biotin were available in the laboratory and described in **Table D.I-1** (Patricelli *et al.*, 2001; Kolodziejek *et al.*, 2011; Richau *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2015).

D.1.2.b Plant material and growth conditions

Oilseed rape (*Brassica napus* L. genotype Aviso) plants were cultivated at the vegetative stages in a greenhouse under a 16h light regime at 20°C (day)/15°C (night) with a PAR (Photosynthetically Active Radiation) of 400 $\mu\text{moles photon}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ at the canopy. After germination, seedlings were transferred into 2.5 L pots containing mixed vermiculite/perlite (1:2 v/v) and cultivated with 25% Hoagland nutrient solution (1.25 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.25 mM KNO_3 , 0.5 mM MgSO_4 , 0.25 mM KH_2PO_4 , 0.2 mM $\text{EDTA}\cdot 2\text{NaFe}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 14 μM H_3BO_3 , 5 μM MnSO_4 , 3 μM ZnSO_4 , 0.7 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.7 μM CuSO_4 , 0.1 CoCl_2). After six weeks (Day 0 (D0) of the experiment), plants were supplied with 25% Hoagland solution containing two different concentrations of nitrate: high (HN: 3.75 mM) or low nitrate (LN: 0.375 mM NO_3^- with a compensation of Ca and K elements by adding 1.25 mM $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 0.875 mM KCl). Leaves were numbered in order of their appearance where leaf rank n°1 (L1) was the oldest leaf. At D0, a mature leaf becoming senescent during the experiment (leaf rank n°12 (L12)) was chosen on the basis of its leaf area determined with a LI-COR 300 area meter (LI-COR, Lincoln, NE, USA) and chlorophyll content with a SPAD meter (Soil Plant Analysis Development; Minolta, SPAD-502 model): mean leaf area value of $62.49 \text{ cm}^2 \pm 9.16 \%$ variation; mean SPAD value of $52.20 \pm 5.52 \%$ variation). Plants were harvested after 0, 16 and 23 days of treatment (D0, D16 and D23) and anthocyanin levels of L12 were measured before each harvest by an optical sensor system (Multiplex®, Orsay, France) as previously described by D'Hooghe *et al.* (2013). Laminae of L12 were frozen (-80°C) and used for proteomics and molecular analyses.

D.1.2.c Protease activity associated with degradation of RuBisCO (RBCL)

Soluble proteins were extracted by grinding 200 mg of frozen leaf tissue with 500 μL citrate-phosphate buffer (20 mM citrate, 160 mM phosphate, pH 6.8 containing 50 mg of polyvinylpyrrolidone (PVPP)). After centrifugation (1h, 12 000 *g*, 4 °C), the resulting supernatant containing proteins was used for determination of the quantity of soluble proteins by protein-dye staining (Bradford, 1976) using bovine serum albumin (BSA) as standard.

To identify the proteases classes associated with protein remobilization during leaf senescence of plants subjected to nitrate limitation (LN) or ample nitrate supply (HN), the degradation of RuBisCo large subunit (RBCL) by proteases within the soluble protein extract was studied with or without inhibitors of specific protease classes by using a method modified from Girondé *et al.* (2015b) (Supplemental data Fig. D.I-S1). In this method, the RBCL was used as a target of proteolysis because this stromal soluble protein is one of the main substrate of proteases during leaf senescence. Protease activities were determined at pH 5.5 and 7.5. To achieve this, 8 or 12 μg of proteins were incubated in a 200 μL final volume with sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.5) in the presence or absence of 50 μM of E-64, Ac-YVAD-cmk, aprotinin or pepstatin A (Table D.I-1). Otherwise, to study cysteine proteases, 2 mM of dithiothreitol (DTT)

were added in this mix. The incubation was performed for 30 min at 37°C under gentle agitation. Alternatively, 8 or 12 µg of proteins were incubated for 90 min at 37°C in a 200 µL final volume with Tris-base buffer (125 mM; pH 7.5) without inhibitor or in the presence of 50 µM of epoxomicin. An equal volume of dimethylsulfoxide (DMSO) was added to the No-Inhibitor-Control. Degradation was stopped by adding 1 mL of ice-cold acetone. The pellet obtained after centrifugation (15 min, 16 000 *g*, 4 °C) was dissolved in 2X SDS-PAGE gel loading buffer (140 mM sodium dodecyl sulfate, 200 mM Tris, 20% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 0.3 mM Bromophenol Blue) and heated at 90°C for 10 min. To determine the initial quantity of RBCL, the protein extract was also treated without inhibitor and the proteolytic reaction was stopped immediately by adding 1 mL of ice-cold acetone, as described above (Supplemental data **Fig. D.I-S1**). Soluble protein extracts were separated on a 4-15% gradient in SDS-PAGE precast Stain-free gels (Mini-PROTEAN® TGX™ Stain Free, Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) and scanned under UV light with a Gel Doc™ EZ scanner (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). The amount of RBCL (expressed as volume) was quantified by using ImageLab™ software (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) according to the manufacturer's instructions. The percentage of RBCL degradation was calculated as the difference in quantity between non incubated and incubated samples without inhibitors. The percentage of inhibition due to the different inhibitors was calculated as the difference in degradation without or in the presence of inhibitors.

D.I.2.d Protease activity profiling of extracts

Soluble proteins were extracted by grinding 200 mg of frozen leaf tissue in a microtube and mixing with 1 mL of water. The extracts were cleared by centrifugation (5 min, 13 000 *g*, 4 °C). The concentration of soluble proteins extract in equivalent serum albumin bovine (BSA) was quantified by protein-dye staining (Bradford, 1976).

The *in vitro* labelling of protease activities was carried out by incubating 20 µL of protein extract in a 200 µL final volume mix containing 0.5 µM of probe (MV201 or JOPD1), 50 mM of NaAc buffer (pH 5.5) and 2 mM DTT. Alternatively, 20 µL of protein extract were incubated in a 200 µL final volume of 50 mM Tris-base buffer (pH 7.5) containing 0.5 µM of MVB072 or 0.25 µM of FP-Rh. Samples were incubated for 4 h (MV201 or JOPD1) or 1 h (MVB072 or FP-Rh) in the dark under gentle agitation. A mixture of equal volumes of soluble protein extracts of leaves (D0, D16 and D23) treated under HN or LN conditions was used as control, and 20 µL of each mixture were treated as described above. An equal volume of DMSO was added to the No-Probe-Control (NPC). Moreover, competition experiments consisting of a pre-treatment with 50 µM of E-64, ac-YVAD-cmk, epoxomicin or DFP for 30 min before adding probes MV201, JOPD1, MVB072 or FP-Rh respectively was carried out in parallel aliquots to control the specificity of probes. Proteins were precipitated after labelling by adding 1 mL of ice-cold acetone and centrifuging (15 min, 16 000 *g*, 4 °C). The pellet was dissolved in 2X SDS-PAGE gel-loading buffer, heated at 90°C for

10 min and separated on 12% SDS-PAGE gels. Labelled proteins were visualized by *in-gel* fluorescence scanning using a Typhoon 9400 scanner (GE Healthcare Life Science) with excitation and emission wavelengths at 532 and 580 nm respectively. Fluorescence signals were quantified by ImageJ software. Then, gels were stained with Coomassie Brilliant Blue stain (0.5 g CBB G250, 10% acetic acid, 45% methanol in ultra-pure water (v/v)), destained (10% acetic acid, 40% methanol in ultra-pure water (v/v)) and scanned to control the protein quantity. Fluorescence signals were used to determine specific activity (expressed as fluorescence intensity.mg⁻¹ protein).

In order to characterize the proteases observed on gels by the fluorescent bands, a pull-down of biotinylated proteins was performed after labelling with a biotin-tagged probe. For this, 700 µg of protein was labelled with 5 µM of DCG04 or FP-biotin in labelling buffer (50 mM NaAc pH 5.5, 2 mM DTT for DCG04 or 50 mM Tris-buffer, pH 7.5 for FP-biotin). Samples were incubated at room temperature in the dark under gentle agitation for 4 h (for DCG04) or 1 h (for FP-biotin). As control, another aliquot of the same sample was treated as described above without probes. The labelling reaction was stopped and the biotin-proteins were purified using streptavidin beads as described by Chandrasekar *et al.* (2014). The eluted proteins were separated on 12% SDS-PAGE gels and the protein gels were stained overnight with SYPRO Ruby (Life Technologies). Proteins were detected by scanning the gel at an excitation wavelength of 460 nm in ImageQuant LAS 4000 scanner (Filter Y515 Long Pass 500-520 nm; GE Healthcare Life Sciences). Bands were excised and treated with trypsin as described by Kaschani *et al.* (2012). Then, tryptic peptides were desalted using Stage Tips C8 (Thermo scientific, Bremen, Germany) according to the manufacturer's instructions. Finally, peptide samples were analysed in triplicate by nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry (nano-LC-MS/MS) using a Nano-Acquity-UPLC (C18 column of 75 µm × 250 mm, 1.7 µm particle size; Waters) coupled to an Orbitrap Elite tandem mass spectrometer (Thermo Scientific) with a resolution of 120,000 full-width half maximum at mass/charge 400, Top 20 precursor ion selection, and fragmentation performed in collision-induced dissociation (CID) mode. The samples were loaded in 99.5% buffer A (0.1% formic acid in H₂O). The gradient used to elute the peptides was started with a 3 min isocratic gradient composed of 3% buffer B (0.1% formic acid in CH₃CN) followed by a linear gradient from 3–40% of buffer B for 60 min at a flow rate of 250 nL.min⁻¹ and two washes with 97% of buffer B for 3 min. The total length of the analysis was 100 min to allow column re-equilibration.

Raw MS data were converted into mgf files using MSconvert and processed using Mascot software and the following parameters: the error tolerance was fixed at 10 ppm for the precursor ion and at 0.5 Da for the fragment ion. The enzyme used was trypsin and only one missed cleavage was allowed. The post-translational modifications search setting was as follows:

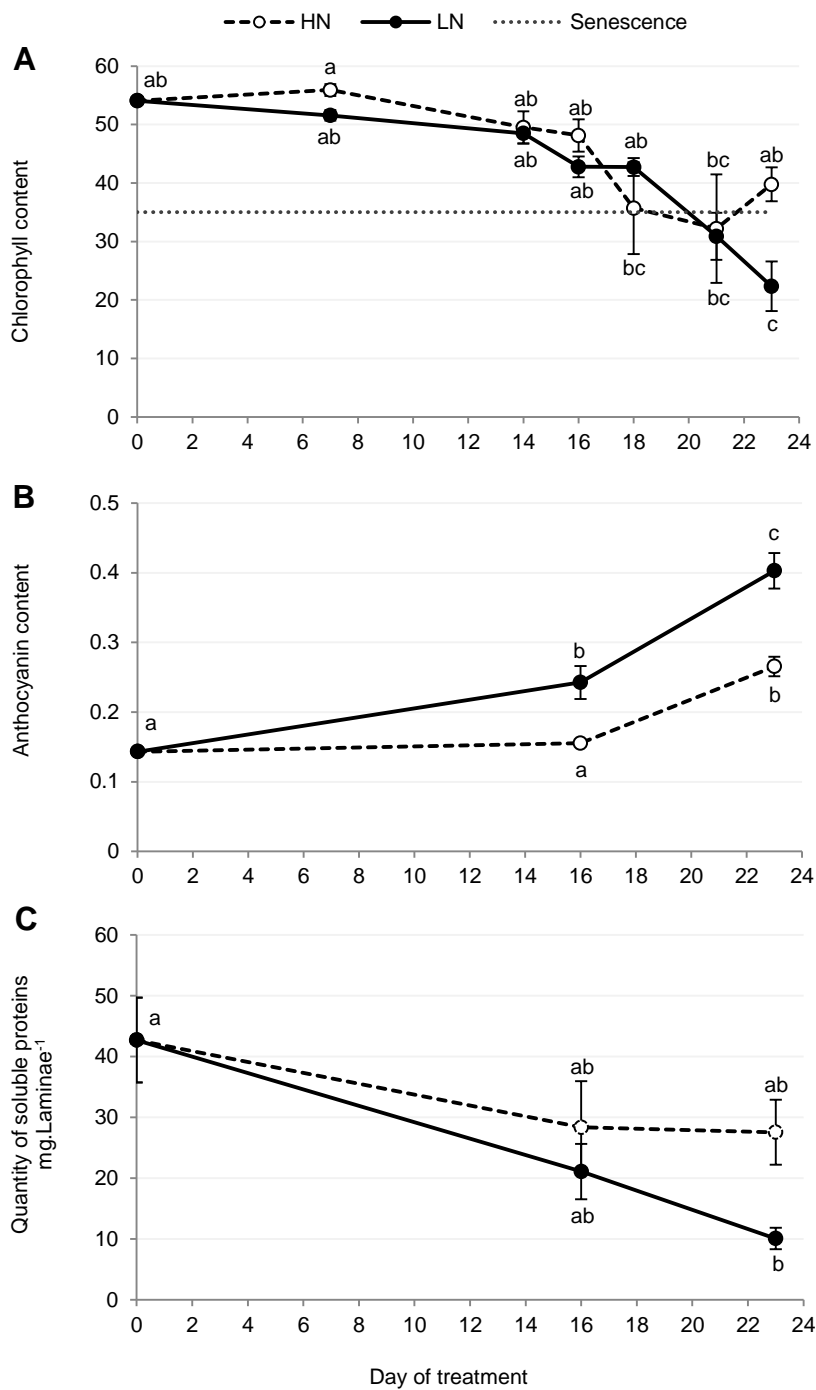


Figure D.I-1: Changes in parameters associated with senescence in a mature leaf of *Brassica napus* L. supplied with ample (HN) or low (LN) nitrate for 23 days.

Six-week-old plants were subjected to ample (HN: 3.75 mM NO₃⁻) or low nitrogen supply (LN: 0.375 mM NO₃⁻) for 23 days. A mature leaf that became senescent during the experiment (Leaf rank n°12) was chosen on the basis of its leaf area determined with a LI-COR 300 area meter. Chlorophyll content was measured with a SPAD meter (A). A leaf was considered as senescent when the chlorophyll content is decreased by at least 40% of the initial value (here the senescence threshold was placed at 35 SPAD units). Anthocyanin content was measured with an optical sensor system (Multiplex®) (B) and the quantity of soluble proteins was determined after extraction by protein-dye staining (Bradford, 1976) (C). Vertical bars indicate ± SE of the mean (n=3). Statistics are represented by letters (P < 0.05, ANOVA, Newman-Keuls test).

fixed modification for cysteine carbamidomethyl and variable modification for asparagine and glutamine deamidation and methionine oxidation. The protein search was performed using the *Brassica napus* 20150610 database (101,040 sequences; 33,618,840 residues). The false discovery rate was estimated empirically from decoy hits; identified proteins were filtered to an estimated 1% FDR (false discovery rate). The assigned protein of best match is provided alongside the GenBank accession number. Score, peptide matches, significant peptide matches (Match(sig)), experimental mass and theoretical mass are also presented. Protein sequences were also matched against sequences of *Brassicacea* proteins using the NCBI Blast Protein Database (algorithm blastp) and better results of blasts are presented with the name of the protein, the organism, the gene accession number and the percentage of sequence identity. Finally, PLCPs were classified according to the classification of Richau *et al.* (2012) while SPs were classified according to the MEROPS database.

D.I.2.e Statistical analysis

For all measurements, three biological repeats were analysed ($n=3$). All the data are presented as the mean \pm standard error (SE). The normality of the data was studied with the Ryan-Joiner test at 95%. Analysis of variance (ANOVA) and the Newman-Keuls test were used to compare the means by using Microsoft® Excel 2010/XLStat® 2014. When the normality law of the data was not respected, the non-parametric test of Kruskal-Wallis was carried out. Statistical significance was postulated at $P<0.05$.

D.I.3 Results and Discussion

In order to characterize key mechanisms that could assist in improving the protein recycling and the leaf NRE of oilseed rape, the objective was to identify senescence-associated proteases (SAPs) implicated in protein degradation during leaf senescence of genotype Aviso, which was previously characterized for its high leaf NRE in response of nitrate limitation (Girondé *et al.*, 2015a).

D.I.3.a Leaf senescence and soluble protein degradation

To study the changes in physiological and biochemical parameters associated with senescence in a mature leaf of oilseed rape, six week old plants were subjected to ample (HN: 3.75 mM NO₃⁻) or low nitrogen supply (LN: 0.375 mM NO₃⁻) for 23 days. Mature leaves at rank n°12 (L12) were chosen for the study of senescence progression *via* the analysis of chlorophyll content, quantity of soluble proteins and protease activities. As expected, a limitation of nitrate (LN) accelerated the leaf senescence processes compared to plants subjected to an ample nitrate supply (HN). Indeed, chlorophyll content was significantly lower after 23 d under LN conditions (22.3 \pm 4 SPAD units) compared to HN supply (39.8 \pm 3) (Fig. D.I-1A). Because leaf redness

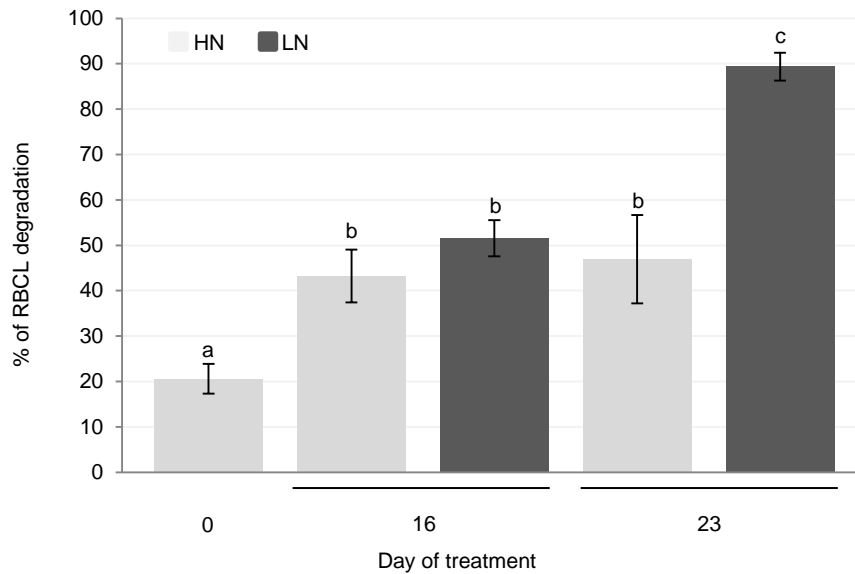


Figure D.I-2: The degradation of RuBisCO (RBCL) at pH 5.5 increases during leaf senescence of *Brassica napus* L. subjected to N limitation (LN) compared to plants with ample nitrate supply (HN).

Soluble proteins were extracted after 0, 16 and 23 days of HN (3.75 mM NO₃⁻) or LN (0.375 mM NO₃⁻) treatment and were incubated in sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.5) for 30 min. at 37°C. The reaction was stopped by adding ice-cold acetone. To determine the initial quantity of RuBisCO (RBCL, large subunit) another sample was also treated as described above but the reaction was stopped immediately. Samples were separated on SDS-PAGE Stain-free gels (Mini-PROTEAN® TGX™ Stain Free), scanned under UV light with a Gel Doc™ EZ scanner and analysed (for details see § D.I.II. Materials and Methods). The degradation of RBCL was calculated as the difference in the quantity between non incubated and incubated samples and expressed as % of RBCL degradation. Vertical bars indicate ± SE of the mean (*n*=3). Statistics are represented by letters (*P* < 0.05, ANOVA, Newman-Keuls test).

through anthocyanin accumulation is commonly considered as a symptom of abiotic stresses especially in case of mineral limitation such as sulfur, phosphorus and N deficiency in many plants (Noodén *et al.*, 1996; Chalker-Scott, 1999; Stewart *et al.*, 2001; Diaz *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2008) including oilseed rape (D’Hooghe *et al.*, 2013), we have studied the changes of anthocyanins in the mature leaf of plants subjected to ample or limited nitrate supply. The level of anthocyanins in L12 had tripled during the 23 d of LN treatment but only doubled under HN treatment (**Fig. D.I-1B**). These results confirm that N limitation can cause a rapid induction of anthocyanins in senescing leaves of oilseed rape. Acting as a “sunscreen” in case of excess light and as scavengers for reactive oxidative species, an accumulation of anthocyanins in leaves may protect the photosynthetic apparatus from photodamage and facilitate the recovery of nutrients, especially N, from senescing leaves of oilseed rape as previously reported in other plants (Noodén *et al.*, 1996; Smillie *et al.*, 1999; Hoch *et al.*, 2003). Furthermore, after 23 d, the nitrate limitation induced the strong degradation of soluble proteins in L12 (-76 %) versus only -35 % for L12 of HN plants (**Fig. D.I-1C**), as described previously for the genotype Aviso (Girondé *et al.*, 2015a).

As the N need of growing organs is mainly fulfilled by the degradation of RuBisCO during leaf senescence (Demirevska-Kepova *et al.*, 2005; Thoenen *et al.*, 2007), we studied, in particular, the degradation of RBCL (Large subunit of RuBisCO) *in vitro* at pH 5.5 or 7.5. At pH 5.5 (**Fig. D.I-2**), the degradation of RBCL by proteases present in extracts of L12 increased at D16 and D23 compared to D0 regardless of the treatment. Nevertheless, after 23 d of nitrate limitation, the RBCL was more degraded (-89.4 ± 3.4 %) than under HN supply (-46.9 ± 9 %). Otherwise, no degradation of RBCL was observed at pH 7.5 regardless of the date or treatment (data not shown). These results suggest that RBCL degradation in oilseed rape might occur outside the plastid in cellular compartments with an acidic pH such as SAVs (Senescence Associated Vesicles) or in the central vacuole through the transfer by RCBs (RuBisCO containing bodies) (Chiba *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2008; Wada *et al.*, 2009; Carrión *et al.*, 2013). Other studies have shown that chloroplast proteins such as RuBisCO can be partially degraded in the chloroplast itself by chloroplastic proteases (Kokubun *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2007; Feller *et al.*, 2008). Even if chloroplasts are unable to carry out complete breakdown of the RBCL, it has been reported that a 44 kDa fragment from cleaved RBCL accumulates in chloroplasts isolated from senescing wheat leaves (Martínez *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2007). Other chloroplastic proteins such as LHCII can be completely degraded in the plastid at pH 7.5 (Zelisko *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2008), and novel chloroplast vesiculation-containing vesicles (CCVs) have been identified and implicated in chloroplast degradation in *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 2014). CCVs containing chloroplast proteins were released from chloroplasts and mobilized to the vacuole for degradation through a pathway that is independent of autophagy and SAVs.

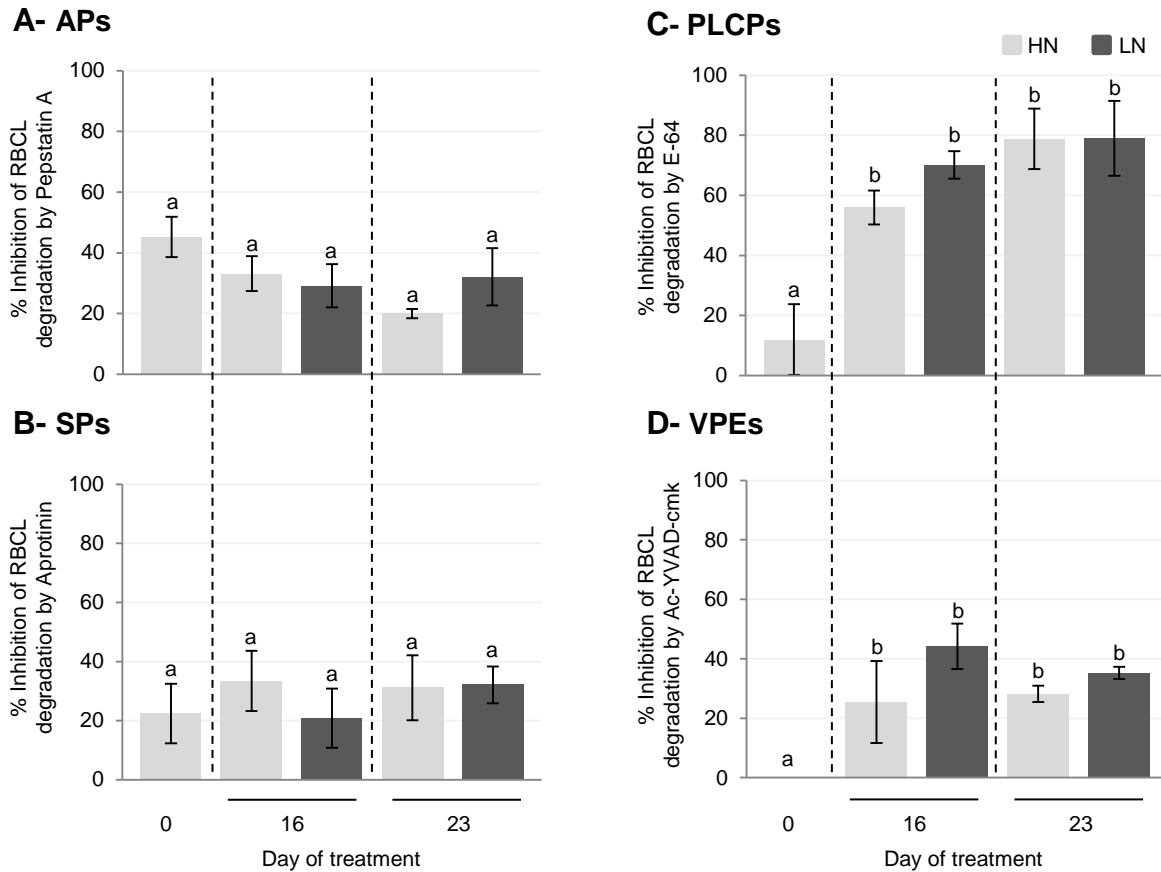


Figure D.I-3: Changes in activities of aspartic proteases (APs, A), serine proteases (SPs, B), papain-like Cys proteases (PLCPs, C) and vacuolar processing enzymes (VPEs, D) at pH 5.5 during leaf senescence of *Brassica napus* L. supplied with ample (HN) or low (LN) nitrate for 23 days.

Soluble proteins were extracted after 0, 16 and 23 days of HN (3.75 mM NO₃⁻) or LN (0.375 mM NO₃⁻) treatment and were incubated in sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.5) for 30 min. at 37°C without inhibitor or in the presence of 50 μM of Pepstatin A (inhibitor of aspartic proteases), Aprotinin (inhibitor of serine proteases), E-64 (specific inhibitor of PLCPs) or Ac-YVAD-cmk (inhibitor of VPEs). The reaction was stopped by adding ice-cold acetone. To determine the initial quantity of RuBisCO (large subunit, RBCL), another sample was also treated as described above but the reaction was stopped immediately. Samples were separated on SDS-PAGE Stain-free gels (Mini-PROTEAN® TGX™ Stain Free), scanned under UV light with a Gel Doc™ EZ scanner and analysed (for details see § D.I.II. Materials and Methods). The degradation of RBCL was calculated as the difference in quantity between non incubated and incubated samples and expressed as % of RBCL degradation while the % of inhibition due to the different inhibitors was calculated as the difference in degradation in the presence or the absence of inhibitors. Vertical bars indicate ± SE of the mean (n=3). Statistics are represented by letters (P < 0.05, ANOVA, Newman-Keuls test).

D.I.3.b Senescence-associated protease (SAP) activities in oilseed rape leaves

To determine which protease classes could be involved in the degradation of soluble proteins during senescence (**Fig. D.I-1C**, **Fig. D.I-2**), we studied protease activities *in vitro* at acidic pH (5.5) or neutral pH (7.5) during leaf senescence of plants subjected to N limitation (LN) compared to plants with ample nitrate supply by two different methods. The first method consisted in studying the RBCL degradation only at acidic pH (analysis of RBCL degradation was not performed at neutral pH because of the low contribution of proteolytic activities at this pH, see § D.I.II.3) in the presence or absence of known inhibitors of specific protease classes. Then, in order to identify active proteases at pH 5.5 and pH 7.5, we performed in parallel a protease activity profiling during leaf senescence using activity-based probes specific for different protease classes (van der Hoorn and Kaiser, 2012). Results indicated that many classes of proteases were active during leaf senescence of oilseed rape, including the proteasome, aspartic, serine and cysteine proteases.

D.I.3.b.1 Aspartic proteases (APs)

At pH 5.5, the presence of pepstatin A (inhibitor of aspartic proteases) at D0 inhibited RBCL degradation by $45.2 \pm 6 \%$ at D0 but this was not increased at D16 or D23 under the HN or LN treatments (**Fig. D.I-3A**). These results showed that APs seem to be active at pH 5.5 during senescence but these activities are not affected by an acceleration of senescence in LN plants. This is in agreement with previous proteomic studies reporting that the abundance of an aspartic protease was maintained to a high level during leaf senescence of *Brassica napus* (Desclos *et al.*, 2009). Several studies have demonstrated that the aspartic protease CND41 may play a crucial role during leaf senescence (Kato *et al.*, 2004; 2005; Diaz *et al.*, 2008). For instance, in tobacco leaves, CND41 has a high activity at acidic pH and this protease was able to degrade RBCL *in vitro* (Kato *et al.*, 2004). The present study supports a role for APs during leaf senescence in oilseed rape, but this might be underestimated because pepstatin A does not inhibit tobacco CND41 (Kato *et al.*, 2004).

D.I.3.b.2 The proteasome

Because the proteasome is physiologically active under neutral pH, the proteasome activity was studied at pH 7.5. In our experiment, RBCL was not degraded at pH 7.5 (data not shown) indicating that, at neutral pH, the proteasome is not implicated in the degradation of RBCL. To detect the active proteasome during senescence, an activity-dependent labelling using MVB072 (a specific probe of the proteasome) was performed (**Fig. D.I-4**, (Kolodziejek *et al.*, 2011)). Labelling with MVB072 allowed the detection of the three catalytic subunits of proteasome: $\beta 1$, $\beta 2$ and $\beta 5$ (**Fig. D.I-4A**). Quantification of the sum of activities of these subunits demonstrated that global proteasome activity remained stable during leaf senescence in oilseed rape supplied with ample or low nitrate (**Fig. D.I-4B**). A similar result was found in dark-induced detached

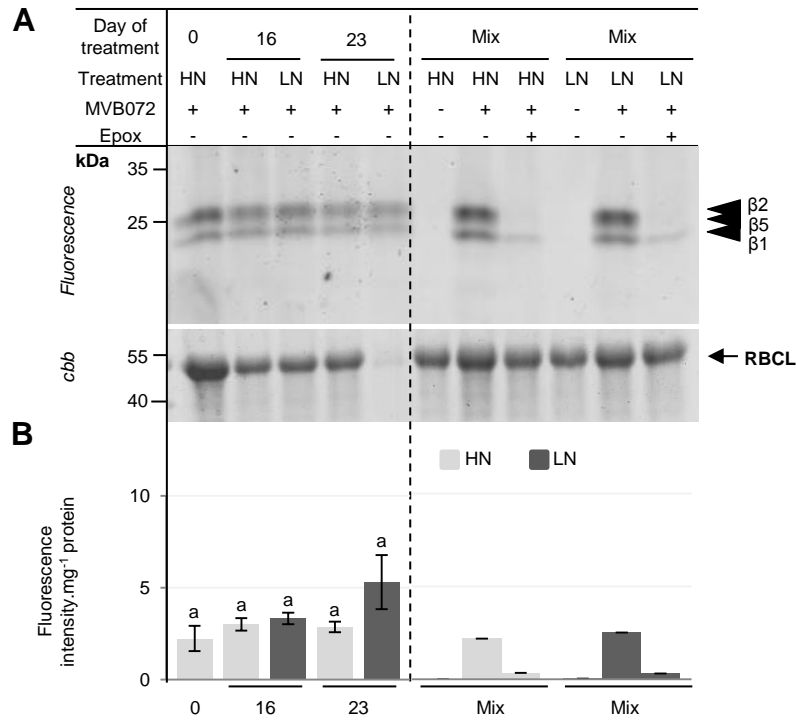


Figure D.I-4: Proteasome activity at pH 7.5 is stable during leaf senescence of *Brassica napus* L. supplied with low nitrate (LN) concentration for 23 days.

Soluble proteins were extracted after 0, 16 and 23 days of HN (3.75 mM NO₃⁻) or LN (0.375 mM NO₃⁻) treatment and were subjected to standard protease activity profiling with MVB072 (specific fluorescent probe of proteasome) (pH 7.5; 1 h labelling). These extracts were separated by SDS-PAGE and scanned to detect fluorescence (A). The Coomassie brilliant blue-stained (cbb) protein gel shows the total amount of input proteins after incubation. Mix corresponds to a mix of 0, 16 and 23 day extracts (HN or LN) in the presence of MVB072, MVB072 and epoxomicin (specific inhibitor of proteasome) or in the absence of MVB072 (no probe control). The fluorescence intensity representative of the proteasome activity was calculated relative to the protein amount (B). Black arrowheads correspond to the position of catalytic subunits β1, β2 and β5 of the proteasome. The gel presented in this figure is representative of three biological replicates. Vertical bars indicate ± SE of the mean of three biological replicates. Statistics are represented by letters ($P < 0.05$, ANOVA, Newman-Keuls test).

senescing leaves of wheat, which have a constant activity of the 20S proteasome (Roberts *et al.*, 2002). Several studies also suggest that the proteasome remains functional until late stages of senescence (Roberts *et al.*, 2012). However, a study of proteomic events associated with N remobilization during leaf senescence of oilseed rape demonstrated that the $\beta 1$ subunit was accumulated upon N limitation or starvation (Desclos *et al.*, 2009). These data suggest that the proteasome play an important role during senescence, not particularly in the remobilization of Rubisco, but for example to limit the production of reactive oxygen species and/or to contribute to the degradation of other damaged proteins.

D.I.3.b.3 Serine proteases (SPs)

Because SPs are located in the vacuole (Parrott *et al.*, 2007) and in the chloroplast (Antão *et al.*, 2005; Roberts *et al.*, 2012), SP activities were studied using (i) RBCL as substrate, under acidic pH with or without the SP inhibitor aprotinin (Fig. D.I-3B) and (ii) a standard protease activity profiling of SPs using FP-Rh, a specific fluorescent probe of serine proteases performed at pH 7.5 (Fig. D.I-5).

The presence of aprotinin (inhibitor of SPs) at D0 inhibited RBCL degradation by 22.4 %, but this was not increased at D16 or D23 under the HN or LN treatments (Fig. D.I-3B). It seemed that SPs were physiologically active under acidic pH and were able to degrade RBCL but their contribution was relatively low when compared to other protease classes (Fig. D.I-3). A study on leaves of naturally senescing wheat also suggested that SPs participate in RBC degradation and N remobilization (Roberts *et al.*, 2011). Otherwise, our data suggest that at neutral pH, SPs do not contribute significantly to RBCL proteolysis during leaf senescence of oilseed rape, irrespective of the nitrate supply.

To verify if SPs were active at neutral pH, an activity-dependent labelling using FP-Rh (a specific probe of SPs) was carried out at pH 7.5 (Fig. D.I-5). Many labelled serine hydrolases were detected after labelling with FP-Rh at pH 7.5 (Fig. D.I-5A). Fluorescent bands were detected at ~70, ~40-50, ~38, ~35 and ~25-30 kDa and these signals were absent in the no-probe controls and suppressed upon pre-treatment with DFP. Quantification demonstrated that global labelling of serine hydrolases was up-regulated during leaf senescence in response to a limitation of nitrate (Fig. D.I-5B). This was due to an increase in serine hydrolase labelling between D0 and D23 at ~38-50 kDa ($p = 0.007$), ~35 kDa ($p = 0.021$) and ~25-30 kDa ($p = 0.035$) (data not shown). In response to nitrate limitation, labelling of serine hydrolases at ~70 kDa also increased between D0 and D16.

To identify the labelled SPs, a pull-down of biotinylated proteins from L12 of plants subjected to LN supply over 23 d was carried out after activity-dependent labelling using the biotin-tagged FP probe. Several labelled SPs were identified from signals at 70 and 35-40 kDa (Fig. D.I-S2 and Table D.I-2). SPs at 70 kDa were identified as four different subtilisins (S8) and seven

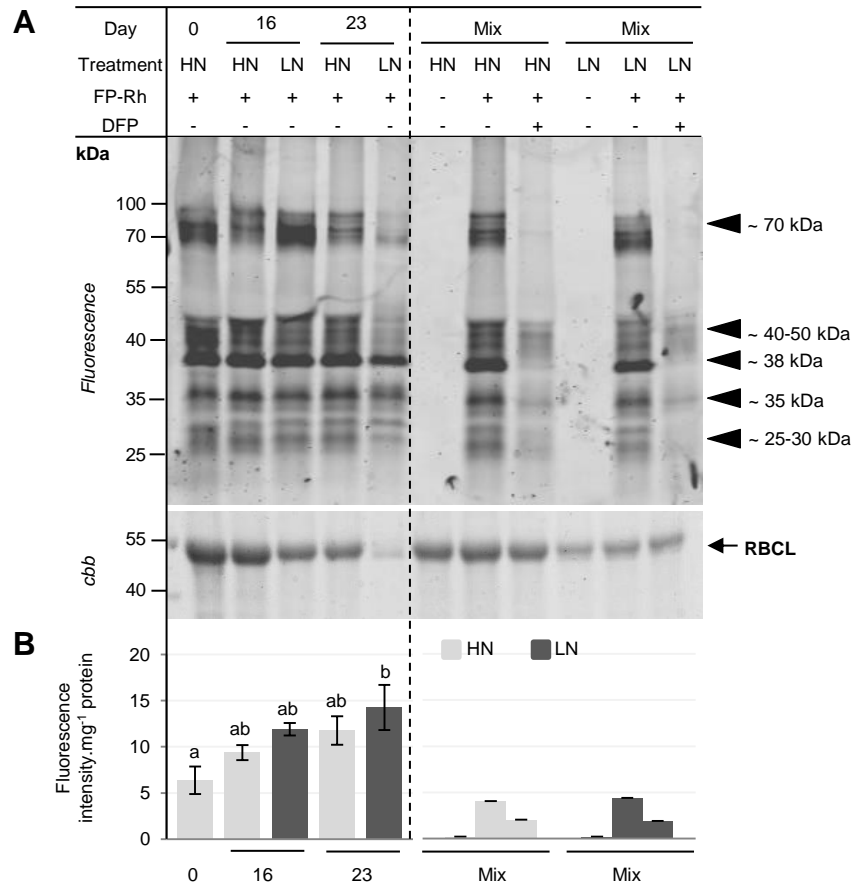


Figure D.I-5: Activity of serine proteases at pH 7.5 is up-regulated during leaf senescence of *Brassica napus* L. supplied with low (LN) nitrate for 23 days.

Soluble proteins were extracted after 0, 16 and 23 days of HN (3.75 mM NO₃⁻) or LN (0.375 mM NO₃⁻) treatment and were subjected to standard protease activity profiling with FP-Rh (specific fluorescent probe of serine proteases) (pH 7.5; 1 h labelling). These extracts were separated by SDS-PAGE and scanned to detect fluorescence (A). The Coomassie brilliant blue-stained (cbb) protein gel shows the total amount of input proteins after incubation. The fluorescence intensity representative of the serine protease global activity was calculated relative to the protein amount (B). Mix corresponds to a mix of 0, 16 and 23 day extracts (HN or LN) in the presence of FP-Rh, FP-Rh and DFP (specific inhibitor of serine proteases) or in the absence of FP-Rh (no probe control). Black arrowheads correspond to proteases already active at day 0. The gel presented in this figure is representative of three biological replicates. Vertical bars indicate ± SE of the mean of three biological replicates. Statistics are represented by letters ($P < 0.05$, ANOVA, Newman-Keuls test).

Table D.I-2: LC-MS/MS identification of serine proteases labelled with the probe FP-biotin in a senescent leaves of *Brassica napus* L. after 23 days of nitrate limitation.

To characterize the serine proteases observed by fluorescent bands on gels (Fig. D.I-5), a pull-down of biotinylated proteins was prepared after labelling with biotin-tagged probe FP and detected zones were excised, treated and analysed by LC-MS/MS (for details see § D.I.II. Materials and Methods). LC-MS/MS spectra were searched against the *Brassica napus* L. database using MASCOT 2.5.0 and only scores higher or equal to 30 were considered. The assigned protein of best match is provided with the GenBank accession number. Score, peptide matches, significant peptide matches (Match(sig)), experimental mass and theoretical mass are also presented. Protein sequences were also matched against sequences of *Brassicaceae* proteins using the NCBI Blast Protein Database (algorithm blastp) and better results of blasts were presented with the name of the protein, the organism, the gene accession number and the percentage of sequence identity. Finally, proteins were classified according to MEROPS database.

Cutting zone (kDa)	Protein accession no. [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no.	Score	Matches	Match (sig)	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Result of BLAST Protein [<i>Brassica napus</i>]-Protein [organism] / NCBI accession no. / % identity	Class
	Serine peptidases							
	BnaC05g15670D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674888482	91	5	4	82234	81657.74	PREDICTED: subtilisin-like protease [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685318103 / 99 % Serine-type endopeptidase SBT5.2 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / gi 18394832 / 88 %	Subtilisins S8
	BnaA09g07410D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674914517	50	8	4	79767	79246.24	PREDICTED: subtilisin-like protease [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685354526 / 85 % Subtilisin-like protease [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / gi 18425181 / 80 %	Subtilisins S8
70	BnaCnng55020D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674865926	41	6	3	79945	79310.97	PREDICTED: subtilisin-like protease [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685354526 / 88 % Subtilisin-like protease [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / gi 18425181 / 78 %	Subtilisins S8
	BnaA03g44620D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674934691	37	4	2	145873	144766.5 5	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: tripeptidyl-peptidase 2-like [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685292411 / 97 % Tripeptidyl peptidase II [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / gi 30685230 / 92 %	Subtilisins S8

Table D.I-2: Continued

Cutting zone (kDa)	Protein accession no. [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no.	Score	Matches	Match (sig)	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Result of BLAST Protein [<i>Brassica napus</i>]-Protein [organism] / NCBI accession no. / % identity	Class
Serine peptidases								
	BnaC08g09650D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674896006	193	14	6	91150	90237.22	PREDICTED: acylamino-acid-releasing enzyme-like isoform X1 [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685342486 / 95 % Acylamino acid-releasing enzyme [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / gi 42566792 / 84 %	POPLs S9
	BnaA08g30180D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674878293	105	9	4	90670	89814.83	PREDICTED: acylamino-acid-releasing enzyme-like isoform X1 [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685342486 / 98 % Acylamino acid-releasing enzyme [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / gi 42566792 / 84 %	POPLs S9
	BnaC06g11680D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674926851	74	15	8	91270	90528.61	PREDICTED: acylamino-acid-releasing enzyme-like isoform X2 [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685307956 / 98 % Acylamino acid-releasing enzyme [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / gi 42566792 / 84 %	POPLs S9
70	BnaCnng28400D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674876980	73	13	4	82654	81850.38	PREDICTED: prolyl endopeptidase-like [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685274241 / 97 % Prolyl oligopeptidase [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / gi 79382269 / 90 %	POPLs S9
	BnaA06g02850D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674910247	52	5	1	81086	80567.57	PREDICTED: prolyl endopeptidase-like [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685314489 / 99 % Prolyl oligopeptidase family protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / gi 18403046 / 92 %	POPLs S9
	BnaA09g04940D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674913439	49	2	2	82828	82423.77	PREDICTED: dipeptidyl peptidase 8 [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685260765 / 99 % Prolyl oligopeptidase family protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / gi 15237923 / 87 %	POPLs S9
	BnaA07g32380D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674946140	34	9	1	82658	81854.18	PREDICTED: prolyl endopeptidase [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685338483 / 99 % Prolyl oligopeptidase [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / gi 79382269 / 93 %	POPLs S9

Table D.I-2: Continued

Cutting zone (kDa)	Protein accession no. [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no.	Score	Matches	Match (sig)	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Result of BLAST Protein [<i>Brassica napus</i>]-Protein [<i>organism</i>] / NCBI accession no. / % identity	Class
Other serine hydrolases								
	BnaA06g19010D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674894935	64	9	6	35699	35550.37	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685320048 / 99 % Probable carboxylesterase 12 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / gi 15228425 / 80 %	CXE
70	BnaC07g46400D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674961158	53	3	3	29121	31685.13	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: methylesterase 9-like [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685295161 / 93 % Methylesterase 9 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / gi 15235445 / 81 %	MES
	BnaC01g01910D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674964800	35	2	2	28978	31540.79	PREDICTED: methylesterase 9-like [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685256421 / 95 % Methylesterase 9 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / gi 15235445 / 76 %	MES
	BnaA06g19010D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674894935	56	13	1	35699	35550.37	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685320048 / 99 % Probable carboxylesterase 12 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / gi 15228425 / 80 %	CXE
	BnaA02g33270D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674902269	52	3	2	17528	17424.86	PREDICTED: probable carboxylesterase 120 [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685278524 / 100 % Carboxylesterase 20 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / gi 15241725 / 63 %	CXE
35-40	BnaC07g22410D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674930271	44	4	2	38711	38449.32	PREDICTED: probable carboxylesterase 7 isoform X1 [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685325292/ 88 % Probable carboxylesterase 7 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / gi 15227669 / 70 %	CXE
	BnaC07g46400D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674961158	45	3	2	29121	31685.13	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: methylesterase 9-like [<i>Brassica rapa</i>] / gi 68529516 / 93 % Methylesterase 9 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / gi 15235445 / 81 %	MES
	BnaA01g00900D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674958220	43	5	2	28956	28632.94	PREDICTED: methylesterase 9-like [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685256421 / 99 % Methylesterase 9 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / gi 15235445 / 77 %	MES

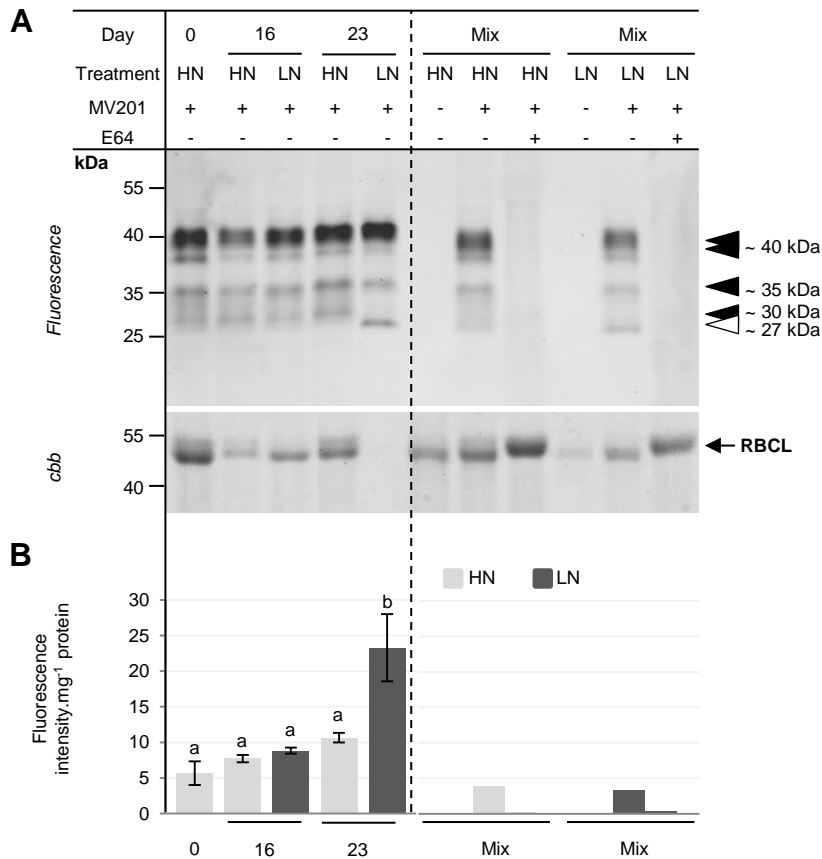


Figure D.I-6: Detection of up-regulated PLCP activities during leaf senescence of *Brassica napus* L. supplied with low (LN) nitrate for 23 days.

Soluble proteins were extracted after 0, 16 and 23 days of HN (3.75 mM NO₃⁻) or LN (0.375 mM NO₃⁻) treatment and were subjected to standard protease activity profiling with MV201 (specific fluorescent probe of PLCPs) (pH 5.5; 4 h labelling). These extracts were separated by SDS-PAGE and scanned to detect fluorescence (A). The Coomassie brilliant blue-stained (*cbb*) protein gel shows the total amount of loaded proteins after incubation. Mix corresponds to a mix of 0, 16 and 23 day extracts (HN or LN) in the presence of MV201, MV201 and E64 (specific inhibitor of PLCPs) or in the absence of MV201 (no probe control). The fluorescence intensity representative of the PLCP activity was calculated relative to the protein amount (B). Black arrowheads correspond to proteases already active at day 0 while the white arrowhead shows induced proteases. The gel presented in this figure is representative of three biological replicates. Vertical bars indicate ± SE of the mean of three biological replicates. Statistics are represented by letters ($P < 0.05$, ANOVA, Newman-Keuls test).

prolyl oligopeptidase-like proteases (POPLs, S9) (**Table D.I-2**). In *Arabidopsis thaliana*, activity-dependent labelling with similar probes also permitted the identification of POPLs (S9) and subtilase-like (S8) proteases at 70 kDa (Kaschani *et al.*, 2009; 2011; van der Hoorn and Kaiser, 2012). Some studies have indicated a role for subtilases during natural senescence in wheat and barley leaves (Roberts *et al.*, 2006; Parrott *et al.*, 2007; Roberts *et al.*, 2011). In addition, during the programmed cell death (PCD) induced by victorin or heat shock treatment, subtilisins (particularly active at neutral pH) are required for RuBisCO cleavage (Coffeen *et al.*, 2004). These results may indicate that the RBCL is not degraded at pH 7.5 *in vitro*. Thus, RBCL does not seem to be the direct target of SPs that are active at neutral pH, in contrast to those active at acidic pH. Interestingly, BnaA03g44620D corresponds to tripeptidyl peptidase II (TPPII), which degrades peptides released by the proteasome (Book *et al.*, 2005). In parallel, four carboxylesterases (CXEs) were identified at both 70 and 35-40 kDa while the three methylesterases (MESs) in *Brassica napus* correspond to the methylesterase 9 of *Arabidopsis thaliana* (AtMES-9). MESs can hydrolyze methylsalicylate, methyljasmonate, and methylindoleacetic acid and may play a role in the regulation of these plant hormones (Vlot *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008). Additional experiments are required to characterize the targets of these SPs to determine their role in the leaf senescence of oilseed rape.

D.I.3.b.4 Cysteine proteases (CPs): PLCPs and VPES

CP activities were studied under acidic pH (5.5) because these proteases are located in the vacuole or in SAVs (Otegui *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2007). CP activities were studied firstly using RBCL as substrate, with or without E-64 (inhibitor of papain like cysteine proteases (PLCPs)) or Ac-YVAD-cmk (inhibitor of vacuolar processing enzymes (VPEs)) (**Fig. D.I-3C; Fig. D.I-3D**). Additionally, a standard protease activity profiling of PLCPs and VPES using the probes MV201 or JOPD1, specific fluorescent probes of PLCPs and VPES respectively, were performed at pH 5.5 (**Figs. D.I-6 and D.I-7**).

The inhibition of RBCL degradation due to E-64 (inhibitor of PLCPs) was significantly more effective at D23 (78.8 % inhibition (HN); 79 % (LN)) than at D0 (11.9 %) (**Fig. D.I-3C**). The degradation of RBCL was also significantly inhibited by Ac-YVAD-cmk (inhibitor of VPES) after 16 or 23 d in L12 of HN and LN plants (**Fig. D.I-3D**). These results show that the increase in RBCL degradation during senescence (**Fig. D.I-2**) correlates with a significant increase in PLCP and VPE activities at pH 5.5 focused on the RBCL degradation (**Fig. D.I-3C and Fig. D.I-3D**). Otherwise, this increase was not significantly different between HN and LN samples.

The results obtained by protease activity profiling at pH 5.5 with MV201 (specific fluorescent probe for PLCPs) or JOPD1 (specific fluorescent probe for VPES) are presented in **Figures D.I-6 and D.I-7**, respectively. Many PLCPs were detected after labelling with MV201 at pH 5.5 (**Fig. D.I-6A**): at ~40, ~30-35 and ~27 kDa and these signals were absent in the no-probe controls

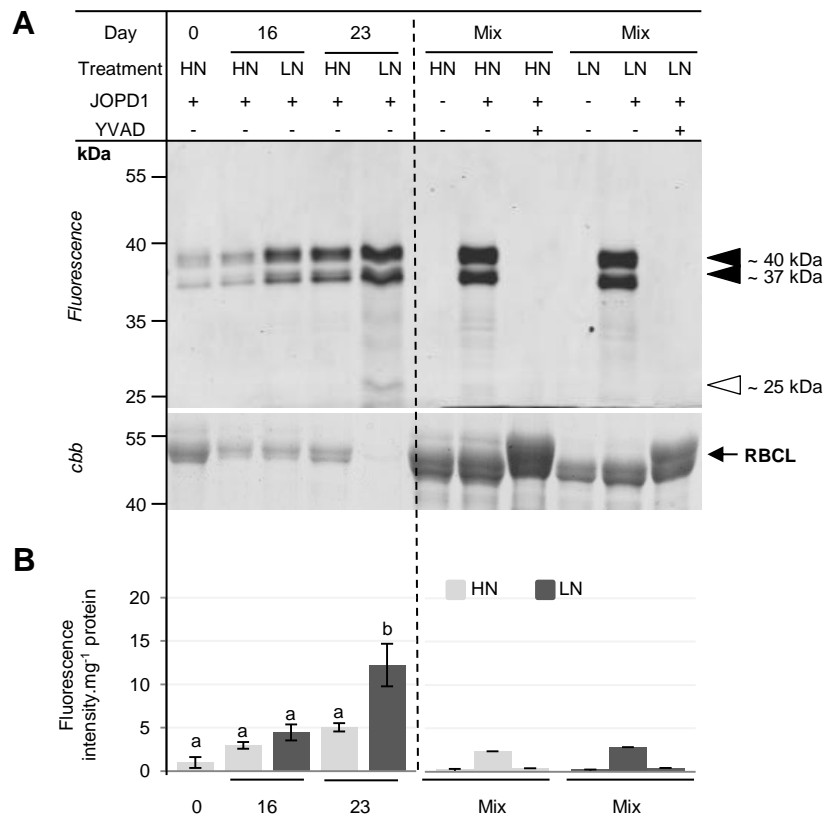


Figure D.I-7: Activity of VPEs is up-regulated during leaf senescence of *Brassica napus* L. supplied with low (LN) nitrate for 23 days.

Soluble proteins were extracted after 0, 16 and 23 days of HN (3.75 mM NO₃⁻) or LN (0.375 mM NO₃⁻) treatment and were subjected to standard protease activity profiling with JOPD1 (specific fluorescent probe of VPEs) (pH 5.5; 4 h labelling). These extracts were separated by SDS-PAGE and scanned to detect fluorescence (A). The Coomassie brilliant blue-stained (cbb) protein gel shows the total amount of input proteins after incubation. Mix corresponds to a mix of 0, 16 and 23 day extracts (HN or LN) in the presence of JOPD1, JOPD1 and YVAD (inhibitor of VPEs) or in the absence of JOPD1 (no probe control). The fluorescence intensity representative of the VPE activities was calculated relative to the protein amount (B). Black arrowheads correspond to proteases already active at day 0 while the white arrowhead shows induced proteases. The gel presented in this figure is representative of three biological replicates. Vertical bars indicate ± SE of the mean of three biological replicates. Statistics are represented by letters ($P < 0.05$, ANOVA, Newman-Keuls test).

and suppressed upon pre-incubation with PLCP inhibitor E-64. In response to nitrate limitation, the total PLCP labelling was significantly up-regulated in L12 of LN plants after 23 d of treatment (**Fig. D.I-6B**). Interestingly, one additional band at ~27 kDa appeared only after 23 d of nitrate limitation. Labelling with JOPD1 at pH 5.5 displayed active VPEs at ~40, ~37 and ~25 kDa and these signals were absent in the no-probe controls and suppressed upon pre-incubation with the VPE inhibitor, Ac-YVAD-cmk (**Fig. D.I-7A**). VPE activities were significantly up-regulated in L12 of plants submitted to LN treatment after 23 d (**Fig. D.I-7B**). Moreover, one additional fluorescent signal appeared at ~25 kDa after 23 d in response to LN treatment (**Fig. D.I-7A**). These results reveal that the increased degradation of soluble proteins such as RBCL under LN correlates with an increase in several PLCP and VPE activities at pH 5.5 (**Fig. D.I-6 and D.I-7**).

It has already been shown that CPs are involved in the degradation of stromal proteins, particularly RBC, during senescence in wheat and tobacco leaves (Thoenen *et al.*, 2007; Prins *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008). A study of dark-induced senescing tobacco leaves showed that RBC degradation in isolated SAVs was blocked by E-64 (Carrión *et al.*, 2013). More specifically, some PLCPs were up-regulated during senescence in sweet potato, soybean and barley leaves (Parrott *et al.*, 2007; 2010; Chen *et al.*, 2010; Esteban-García *et al.*, 2010). In addition, transcript and protein levels of PLCP SAG12 are up-regulated during leaf senescence of oilseed rape subjected to a limitation of N (Desclos *et al.*, 2009). These data strongly indicate that PLCPs can be involved in proteolysis associated with leaf senescence in oilseed rape.

In order to identify the labelled PLCPs, a pull-down of biotinylated proteins from L12 of plants subjected to LN supply for 23 d was performed after activity-dependent labelling using the biotin-tagged DCG04 probe and allowed us to identify five PLCPs (**Fig. D.I-8 and Table D.I-3**) corresponding to the fluorescent band observed at 27 kDa using MV201 labelling (**Fig. D.I-6A**).

Two of these PLCPs were classified as RD21A-like proteases according to the classification of Richau *et al.* (2012) and were identified as close homologues of RD21A from *Arabidopsis thaliana* in the active form at 25 kDa (BnaA10g05390D) and in the intermediate active isoform at 40 kDa (BnaA10g05390D and BnaCnng42340D). RD21 is a PLCP expressed in leaves during senescence and its activity increase in senescing leaves of *Arabidopsis thaliana* (Yamada *et al.*, 2001; van der Hoorn *et al.*, 2004). These results strongly suggested that several isoform of *Brassica napus* proteins may correspond to RD21A in *Arabidopsis thaliana*. This protease is synthesized as an inactive pro-protease that is cleaved to the mature/active form in the vacuolar acidic environment, and it has been proposed that the pro-protease might be contained inside ER-bodies with a non-optimum pH that keeps the protease inactive (Yamada *et al.*, 2001; Müntz *et al.*, 2007).

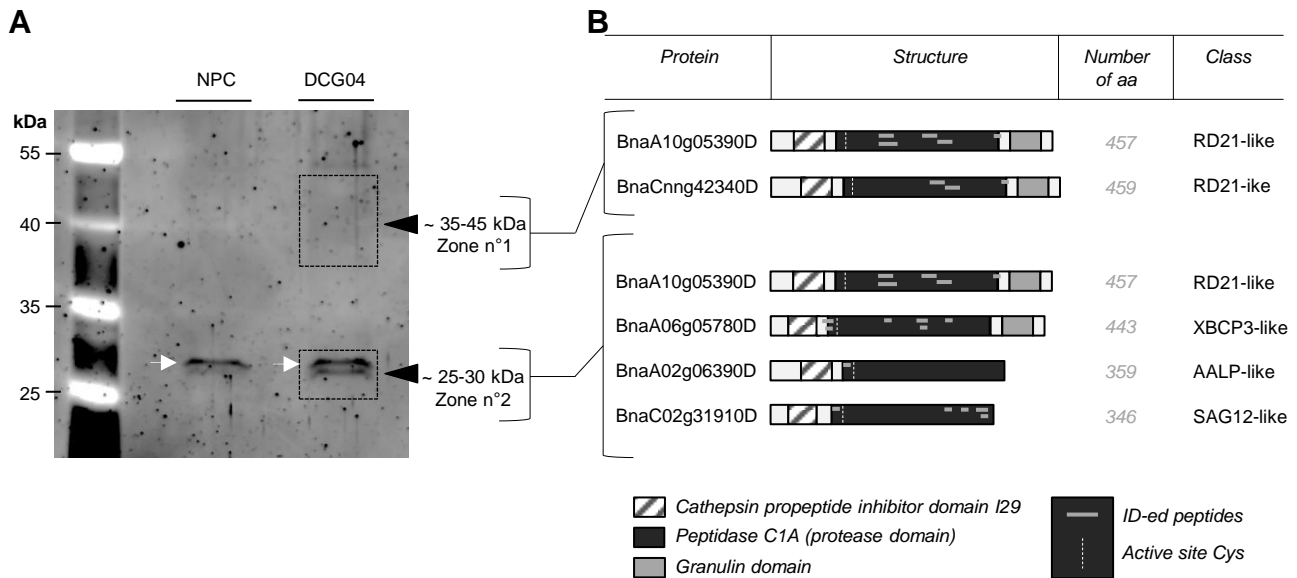


Figure D.I-8: Identification of PLCPs labelled with DCG04 in senescent leaf of *Brassica napus* L. after 23 days of LN treatment.

To characterize the cysteine proteases observed by fluorescent bands on gels (Fig. D.I-6), a pull-down of biotinylated proteins was prepared after labelling with the biotin-tagged probe DCG04 (A). The experiment was performed only on soluble protein extracts from L12 of plants subjected to LN supply after 23 days. The labelling reaction was stopped and the biotin-proteins were purified using streptavidin beads. The eluted proteins were separated on 12% SDS-PAGE gel and stained with SYPRO Ruby. Proteins were detected by scanning the gel at an excitation wavelength of 460 nm in an ImageQuant LAS 4000 scanner. NPC corresponds to the no probe control. Streptavidin beads are indicated by white arrows. Black arrowheads correspond to zones n°1 (35-45 kDa) and n°2 (25-30 kDa), which were excised and analysed by LC-MS/MS. (B) Identified proteases for each zone and their structures. All protease domains are preceded by a cathepsin propeptide inhibitor domain (I29). RD21-like and XBCP3-like proteases also carry a C-terminal extension, containing a granulin domain. Tryptic fragments identified (ID-ed peptides) are indicated in the proteins with gray bars and white bars corresponding to the active site cysteine. Finally, proteins were classified according to the classification of Richau *et al.* (2012).

The three other PLPCs were identified as XBCP3-like, AALP-like and SAG12-like proteases according to the classification of Richau *et al.* (2012). Interestingly, BnA02g06390D (AALP-like protease) is a close homologue of the senescence-associated cysteine protease, BoCP5, an aleurain-like protein in *Brassica oleracea* (gi|18141289). In broccoli florets the suppression of *BoCP5* delays floret senescence (Eason *et al.*, 2005). Consequently, we strongly suspect that BnA02g06390D in oilseed rape has the same proteolysis function during leaf senescence as BoCP5 in *Brassica oleracea*. Finally, BnaC02g31910D is homologous to SAG12 of *Arabidopsis thaliana*. *SAG12* is a senescence-associated marker gene (Lohman *et al.*, 1994) and encodes for the protease SAG12, which was found specifically in the SAVs (Otegui *et al.*, 2005). Moreover, Desclos *et al.* (2009) showed that in *Brassica napus* leaves subjected to a nitrate limitation, *SAG12* expression and SAG12 protein abundance are up-regulated during senescence. Consequently, these results indicate that PLCPs related to RD21A or SAG12 proteases could play a crucial role in the efficient proteolysis associated with leaf senescence of *Brassica napus*, especially in response to N limitation.

In parallel, VPEs are not implicated in the degradation of chloroplastic proteins such as RBC, but they are responsible for the maturation of several vacuolar proteins (Hara-Nishimura *et al.*, 2005). In *Arabidopsis* leaves, it was suggested that α VPEs and γ VPEs (specific to the vegetative organs) regulate the activation of proteins in the lytic vacuole (Kinoshita *et al.*, 1999). For instance, it was reported that *SAG2* and *RD21* genes were induced during leaf senescence and correlated with the induction of VPEs (Kinoshita *et al.*, 1999). Previous work has also suggested that γ VPE might activate proteases involved in amino acid recycling during the senescence of *Arabidopsis thaliana* leaves (Rojo *et al.*, 2003). Because VPEs might be responsible for the maturation/activation of other proteases such as PLCPs, the increase in VPE activities observed in our study (Fig. D.I-3D, Fig. D.I-7) could contribute to an increase in PLCP activities (Fig. D.I-3C, Fig. D.I-6). However, some PLCPs, such as RD21A in *Arabidopsis* (Gu *et al.*, 2012), do not require VPEs for their activation, so their role in senescence remains unclear.

D.I.4 Concluding remarks

In conclusion, many classes of proteases are implicated in protein degradation during natural senescence or senescence induced by nitrate limitation in *Brassica napus* leaves at the vegetative stage. Aspartic proteases, serine proteases, the proteasome and cysteine proteases are highly active at different pH values associated with different cellular compartments. A limitation of nitrate availability, characterized by an acceleration of senescence processes, leads to an increase in proteolytic activities caused by serine proteases and particularly cysteine proteases (both PLCPs and VPEs). As soluble protein degradation in senescing leaves of oilseed rape is crucial for the improvement of N remobilization efficiency (NRE), characterization of protease

Table D.I-3: LC-MS/MS identification of cysteine proteases labelled with the probe DCG04 in senescent leaf of *Brassica napus* L. after 23 days of nitrate limitation.

To characterize the cysteine proteases observed by fluorescent bands on gels (Fig. D.I-6), a pull-down of biotinylated proteins was prepared after labelling with biotin-tagged probe DCG04 and detected zones were excised, treated and analysed by LC-MS/MS (for details see § D.I.II. Materials and Methods). LC-MS/MS spectra were searched against the *Brassica napus* L. database using MASCOT 2.5.0 and only scores higher or equal to 30 were considered. The assigned protein of best match is provided with the GenBank accession number. Score, peptide matches, significant peptide matches (Match(sig)), experimental mass and theoretical mass are also presented. Protein sequences were also matched against sequences of *Brassicaceae* proteins using the NCBI Blast Protein Database (algorithm blastp) and better results of blasts were presented with the name of the protein, the organism, the gene accession number and the percentage of sequence identity. Finally, proteins were classified according to the classification of Richau *et al.* (2012).

Cutting zone (kDa)	Protein accession no. [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no.	Score	Matches	Match (sig)	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Result of BLAST Protein [<i>Brassica napus</i>] - Protein [organism] / NCBI accession no. / % identity	Classification of Richau <i>et al.</i> (2012)
35-45	BnaA10g05390D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674926680	201	14	9	51650	50484.76	Senescence-associated cysteine protease [<i>Brassica oleracea</i>] / gi 18141285 / 92 % Cysteine proteinase RD21a [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / gi 18401614 / 83 %	RD21A-like
	BnaCnng42340D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674871100	65	5	4	51828	50662.93	Senescence-associated cysteine protease [<i>Brassica oleracea</i>] / gi 18141285 / 86 % Cysteine proteinase RD21a [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / gi 18401614 / 82 %	RD21A-like
25-30	BnaA10g05390D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674926680	60	5	4	51650	50484.76	Senescence-associated cysteine protease [<i>Brassica oleracea</i>] / gi 18141285 / 92 % Cysteine proteinase RD21a [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / gi 18401614 / 83 %	RD21A-like
	BnaA06g05780D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674939790	52	8	4	50101	48821.05	PREDICTED: low-temperature-induced cysteine proteinase [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685315355 / 99 % Papain-like cysteine peptidase XBCP3 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / gi 614600257 / 89 %	XBCP3-like
	BnaA02g06390D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674924155	40	2	1	39682	39193.26	PREDICTED: thiol protease aleurain-like [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685271156 / 96 % Senescence-associated cysteine protease [<i>Brassica oleracea</i>] / gi 18141289 / 90 % Thiol protease aleurain [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / gi 18424347 / 89 %	AALP-like
	BnaC02g31910D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674945739	38	7	1	38506	38079.10	Cysteine protease SAG12 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / gi 18422605 / 86 %	SAG12-like

activities is a key for the comprehension of leaf N remobilization. Moreover, the genotypic differences of leaf NRE observed in response to nitrate limitation (Girondé *et al.*, 2015a) might be associated with different or contrasted protease activities during leaf senescence. This study also revealed that activity-based protein profiling is a relevant method for future investigations of genotypic variability of leaf proteolysis efficiency and characterization of protease machinery associated with a high leaf NRE in winter oilseed rape.

Supplemental material

Figure D.I-S1: Proteomic method used to analyse the contribution of each protease class in the degradation of the large subunit of RuBisCO (RBCL).

Figure D.I-S2: Detection of serine proteases labelled with FP-biotin in senescent leaves of *Brassica napus* L. after 23 days of LN treatment.

Acknowledgements

This work was funded by the French National Research Agency (ANR-11-BTBR-004 RAPSODYN - Investments for the Future: Optimisation of the RAPESeed Oil content and Yield under low Nitrogen input) and by a Ph.D. grant to Mrs Marine Poret from the French Ministry of Research and the PhD Doctoral School (EDNBISE, Ecole Doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement). Further financial support was provided by ERA-IB project "PRODuCE", the Max Planck Society, COST CM1004 and the University of Oxford. The authors would like to thank Dr. Nathalie Nési, INRA (UMR 1349 Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, INRA, Agrocampus Ouest, Université de Rennes) who is the leader of this ANR-program, Dr. Jacques Trouverie and Dr. Philippe Etienne for their help in protein blots and for their useful comments on this study, The Target Discovery Institute - Mass Spectrometry Laboratory (University of Oxford) for the proteomic analysis, particularly Marie-Laetitia Thezenas for her kind help with the analysis of proteomics results and finally the UMR EVA technical staff for their skillful assistance. The authors also wish to acknowledge Dr Laurence Cantrill for proofreading and English correction.

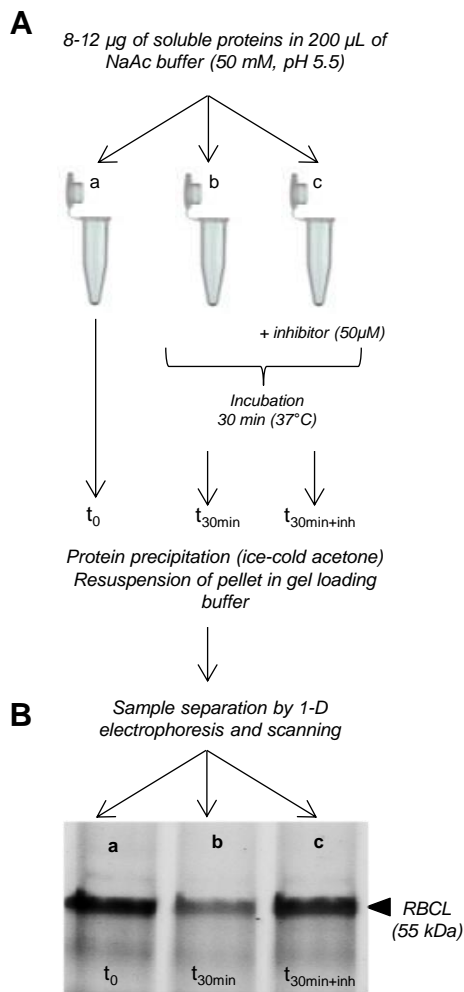


Figure D.I-S1: Proteomic method used to analyse the contribution of each protease class in the degradation of the RuBisCO (RBCL).

Soluble proteins were extracted and incubated in sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.5) for 30 min. at 37°C without inhibitor or in presence of 50 μM of E-64 (specific inhibitor of PLCPs), Ac-YVAD-cmk (inhibitor of VPEs), Pepstatin A (inhibitor of aspartic proteases) or Aprotinin (inhibitor of serine proteases) (A). The reaction was stopped by adding ice-cold acetone. To determine the initial quantity of RuBisCo (large subunit, RBCL), another sample was also treated as described above but the reaction was stopped immediately. Samples were separated on SDS-PAGE Stain-free gels (Mini-PROTEAN® TGX™ Stain Free), scanned under UV light with a Gel Doc™ EZ scanner and analysed (for details see § D.I.II. Materials and Methods) (B). The degradation of RBCL was calculated as the difference in quantity between non incubated and incubated samples and expressed as % of RBCL degradation while the % of inhibition due to the different inhibitors was calculated as the difference in degradation in the presence or absence of inhibitors.

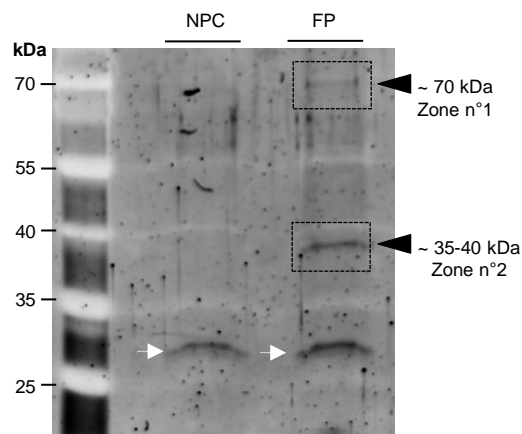


Figure D.I-S2: Detection of serine proteases labelled with FP-biotin in a senescent leaf of *Brassica napus* L. after 23 days of LN treatment.

To characterize the serine proteases observed by fluorescent bands on gels (Fig. D.I-5), a pull-down of biotinylated proteins was prepared after labelling with the biotin-tagged probe FP. We performed the experiment only on soluble protein extracts from L12 of plants subjected to LN supply after 23 days. The labelling reaction was stopped and the biotin-proteins were purified using streptavidin beads. The eluted proteins were separated on 12% SDS-PAGE gel and the gel was stained with SYPRO Ruby (Life technologies). Proteins were detected by scanning the gel at an excitation wavelength of 460 nm in an ImageQuant LAS 4000 scanner (for details see § D.I.II. Materials and Methods). NPC corresponds to the no probe control. Streptavidin beads are indicated by white arrows. Black arrowheads correspond to zone excised n°1 (70 kDa) and n°2 (35-40 kDa).

Chapitre D : Résultats

Chapitre D.II. Caractérisation des activités protéasiques associées à la sénescence des péricarpes afin d'améliorer la remobilisation de l'azote vers les graines chez le colza d'hiver

Contexte : Parmi les plantes de grande culture, le colza est caractérisé par une faible efficacité d'usage du N (EUA). De récentes études ont démontré que des génotypes de colza présentant un meilleur rendement grainier et une plus forte EUA étaient caractérisés par une meilleure remobilisation du N provenant des péricarpes vers les graines lors de la sénescence des siliques (Balint and Rengel, 2011; Girondé *et al.*, 2015b). Ainsi, l'optimisation de l'efficacité de remobilisation du N (ERA) des péricarpes vers les graines semble être une voie prometteuse dans le but d'améliorer le bilan agro-environnemental de cette culture vis-à-vis de l'azote.

Objectif : Comme les protéines correspondent à la principale forme de stockage et la source majeure de composés azotés remobilisables, l'objectif était de caractériser les principales activités protéasiques associées à la remobilisation du N des péricarpes vers les graines durant la sénescence monocarpique chez le colza.

Démarche expérimentale : Afin d'atteindre cet objectif, les teneurs en N et en protéines solubles ainsi que les modifications des activités protéasiques ont été étudiées en cinétique au sein de péricarpes lors de la sénescence monocarpique chez des plantes de colza cultivées en serre. En parallèle, les teneurs en N et en protéines solubles ont été déterminées au sein des graines formées.

Résultats : Dans cette étude, la remobilisation du N des péricarpes est corrélée à la forte dégradation des protéines solubles telles que la RuBisCO. De plus, la diminution du N des péricarpes est également associée à l'augmentation du N et des protéines solubles au sein des graines. En parallèle, il a été observé que la dégradation intense des protéines des péricarpes semble associée à l'augmentation et/ou l'apparition de plusieurs activités de protéases à cystéine et à sérine. En effet, 8 protéases à cystéine actives correspondant à des protéases RD21, SAG12- et aleurain-like ainsi que 16 protéases à sérine actives correspondant à des subtilisin-like et des carboxypeptidases ont été identifiées lors de la sénescence des péricarpes.

D.II. Characterization of proteolytic machinery associated with the senescence of silique walls and the nitrogen remobilization efficiency of *Brassica napus* L.

Marine Poret^{1, 2, 3}, Philippe D'Hooghe^{1, 2, 3}, Balakumaran Chandrasekar^{4, 5}, Renier A. L. van der Hoorn⁴, Jacques Trouverie^{1, 2, 3}, Jean-Christophe Avice^{1, 2, 3*}

¹ Université de Caen Normandie, F-14032 Caen, France

² UCN, UMR INRA–UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France, F-14032 Caen, France

³ INRA, UMR INRA–UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France

⁴ The Plant Chemetics Laboratory, Department of Plant Sciences, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3RB, United Kingdom

⁵ The Plant Chemetics Laboratory, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Carl-von-Linne Weg 10, 50829 Cologne, Germany

Running title: Proteases activities related to N remobilization during pericarp senescence.

Abstract:

Oilseed rape (*Brassica napus* L.) is an oleoproteaginous crop characterized by a low Nitrogen use efficiency (NUE) mainly due to a weak Nitrogen Remobilization Efficiency (NRE) during senescence. As silique envelop (pericarp) corresponds to an essential transfer organ for the N remobilization from vegetative organs towards seeds, it could be hypothesized that the optimization of pericarp N recycling during silique senescence may led to significantly improve the NRE of oilseed rape. Thereby, our goal was to characterize protease activities involved in the N remobilization from pericarps towards the seeds during the monocarpic senescence. To address this question, changes of N and protein contents were studied during the development and senescence of siliques and the identification of active proteases associated with pericarp senescence was performed by using a relevant fluorescent labelling method. Investigations showed that N remobilization in pericarps seems to be related to an efficient proteolysis as observed for the degradation of RuBisCO. Moreover, the proteolysis during pericarp senescence is correlated with a doubling of serine and cysteine proteases activities. These enhanced activities were associated with the increase of subtilisins and carboxypeptidases activities and the specific induction of cysteine proteases activities including RD21-, SAG12-, AALP-like proteases.

Keywords: *Brassica napus* L., silique envelops, nitrogen remobilization efficiency, senescence, protease activity, senescence-associated proteases

Abbreviations: AALP, aleurain-like protease; CP, cysteine protease; CXE, carboxylesterase; N, nitrogen; NPC, no probe control; NRE, nitrogen remobilization efficiency; NUE, nitrogen use efficiency; PAE, pectinacylesterase; PLCP, papain-like cysteine protease; RuBisCO, ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase; SH: serine hydrolases; WAF: week after flowering.

D.II.1 Introduction

Because nitrogen (N) is one of the most essential macro-element for plant growth, the use of N fertilizers increased substantially to improve the seed yield over the last four decades (Mosier, 2002). However, the energy cost of N fertilizers is one of the highest budget for farmers and despite the progress made to optimize the practices of N fertilization, more than 50% of the total N applied to crops in the world is currently lost into the environment (Lassaletta *et al.* 2014; Bouchet *et al.*, 2016). These losses of N provoke environmental pollutions *via* nitrate leaching and/or the production of greenhouse gases such as nitrous oxide by the microorganisms in the soil (Tilman *et al.*, 2002; Billen *et al.*, 2013). Therefore, in the actual context of sustainable agriculture aiming to reduce N fertilization, the improvement of agronomic performance and particularly the N use efficiency (NUE) is becoming crucial for crops such as oilseed rape (*Brassica napus* L.) (Lassaletta *et al.* 2014; Bouchet *et al.*, 2016).

Indeed, as the second and third worldwide main crop for animal feeding (production of meal) and human food (production of oil), oilseed rape is characterized by its high needs of N fertilizers (160-250 kg N ha⁻¹ year⁻¹) but a low NUE with only 50% of N applied finally found into seeds (Schjoerring *et al.*, 1995; Rathke *et al.*, 2005; Avice and Etienne, 2014; Girondé *et al.*, 2015a, b, 2016; Bouchet *et al.*, 2016). The NUE can be defined as the seed yield produced per quantity of N available in soil. The NUE can be divided into 2 main components: the N Uptake Efficiency (NUpE) and the N Utilization Efficiency (NUtE). It was also established that NUtE can be splitted into 2 sub-components: the N Assimilation Efficiency (NAE) and the N Remobilization Efficiency (NRE) (Good *et al.*, 2004; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Several studies have reported that the N uptake limits the NUE after flowering in winter oilseed rape (Schulte auf'm Erley *et al.*, 2007, 2011; Berry *et al.*, 2010; Kessel *et al.*, 2012; Ulas *et al.*, 2013; Wiesler *et al.*, 2001b). Nevertheless, apply more N fertilizers after flowering in order to increase the NUE of oilseed rape is not economically and environmentally relevant and not compatible with the improvement of the agro-environmental balance. This is consistent with recent studies demonstrating that the increase of crop yield becomes partially decoupled of the N inputs and that an increase of N inputs did not increase substantially seed yield of crops (Conant *et al.*, 2013; Lassaletta *et al.*, 2014; Bouchet *et al.*, 2016). According to these observations, actual works

in oilseed rape are focused on the optimization of NUtE particularly the NRE component in order to improve the NUE (Good *et al.*, 2004; Avice and Etienne, 2014).

The N remobilization is particularly associated with the senescence process and crucial to seed yield (Gregersen *et al.*, 2013). During the development of oilseed rape, there are 3 types of senescence: the senescence of cotyledons followed by the sequential senescence at the vegetative stages and finally the monocarpic senescence at the reproductive stages. At the end of reproductive stages, the monocarpic senescence affects all organs to remobilize nutrients from vegetative organs to seeds. During this last phase of development, leaves correspond to the main source organ with a high rate of N remobilization (86%) leading to a weak residual N in fallen leaves (Rossato *et al.*, 2001; Noquet *et al.*, 2004; Malagoli *et al.*, 2005b; Gombert *et al.*, 2010; Ulas *et al.*, 2013; Girondé *et al.*, 2015b) and reflecting the strong leaf NRE of oilseed rape at these stages. However, several studies showed that the N remobilization from stem and silique envelopes (pericarps) are also be determinant for the seed yield (Balint and Rengel, 2008, 2011; Ulas *et al.*, 2013; Girondé *et al.*, 2015b). For instance, genotypic comparisons of oilseed rape showed that genotypes presenting the higher seed yield was also characterized by a better N remobilization from stem and pericarps (Balint and Rengel, 2011; Girondé *et al.*, 2015b). These results revealed the importance of N remobilization from stem and pericarps to sustain the N needs for seed filling and *in fine* to optimize the NUE in oilseed rape.

The pericarp is necessary for the protection and the development of seeds. After flowering, pericarps also correspond to the major photosynthetic organ and act as pivotal tissue for the transport of assimilates provided by photosynthesis, for distribution of nutrients from uptake and for remobilization of recycling compounds from senescence towards seeds. Indeed, the CO₂ fixation in pericarps of oilseed rape is higher than other species and can attain 35% of the leaf photosynthesis capacity (King *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 2001; Furbank *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2015). Moreover, in pea, ¹⁵N labeling experiments showed that 20% of N accumulated in seeds was remobilized from the adjacent pod walls during seed filling (Schiltz *et al.*, 2005). These results demonstrate the crucial role of pericarps for the N remobilization to seed filling in different species including oilseed rape. The allocation of N in seeds is crucial to ensure the protein concentrations of oilseed rape meals. Indeed, studies on the chemical composition of oilseed rape meal demonstrated the relatively high protein content compared to the meals of other crops and this particularity is essential for the oilseed rape economic market (Enami 2011). As pericarps are essential for the N filling of seeds, the optimization of N recycling from pericarps to seeds seems to be also a promising way to improve the NUE and the economic value of oilseed rape culture. Although this important role, mechanisms involved in the N remobilization of pericarps, particularly proteolysis processes, remain largely unknown in oilseed rape.

Many protease classes are involved in senescence mechanisms such as cysteine-, serine-, aspartic-, metallo- proteases and the proteasome (Roberts *et al.*, 2012). In oilseed rape, leaf senescence is particularly associated with an increase of cysteine and serine proteases (Poret *et al.*, 2016). This is also correlated with the high degradation of the main leaf target protein, the RuBisCO (ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase, EC 4.1.1.39). Contrasting to N remobilization associated with leaf senescence, little is known about the mechanisms involved in the N remobilization associated with the senescence process of pericarps in oilseed rape. A microarray study in pericarps of oilseed rape during seed filling identified 52 genes involved in N transport preferentially expressed (Liu *et al.*, 2015). Moreover, amino acid transporters were overexpressed in funiculus particularly when senescence of oilseed rape pericarps was accelerated by shading condition (Tan *et al.*, 2016). Altogether, these previous studies showed that the pericarps are essential organs for the N remobilization to seeds, but surprisingly nothing is known about the protease activities involved in N remobilization in pericarps of oilseed rape. To address this question, the objective of the present study was to characterize protease activities involved in the N remobilization from pericarps to seeds during the monocarpic senescence in order to improve the NUE of oilseed rape. This first characterization of protease activities in senescing pericarps was focused on cysteine- and serine proteases and was performed with a protease activity profiling method using activity-dependent probes.

D.II.2 Material and methods

D.II.2.a Experimental design

Before sowing, seeds of *Brassica napus* L. (cv. Aviso) were sterilized in surface during 30 s in 80% ethanol (v/v), 10 min in 20% sodium hypochlorite (v/v) and washed in ultrapure water. During 2 months, plants were cultivated under greenhouse conditions with a photoperiod of 16h (day) / 8h (night) and a thermoperiod of 20°C (day) / 15°C (night). After these two months of pre-culture, a period of vernalization (69 days) was applied with a thermoperiod of 8°C/10h (day) and 4°C/14h (night) in order to initiate flowering and the reproductive stages of development. During pre-culture and vernalization, plants were cultivated individually in 4 L pot containing mixed 1/3 vermiculite and 2/3 perlite and light was supplied by High Pressure Sodium Lamps (Philips, MASTER GreenPower T400W) with a PAR (Photosynthetically Active Radiations) of 400 $\mu\text{mol photon}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ at the top of the canopy. After vernalization, greenhouse conditions were maintained at a thermoperiod of 20°C (day-16h) and 15°C (night-8h) and plants grew under natural light conditions. During all the experiment, plants were supplied with 25% Hoagland nutrient solution (1.25 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.25 mM KNO_3 , 0.5 mM MgSO_4 , 0.25 mM KH_2PO_4 , 0.2 mM EDTA, 2NaFe $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 14 μM H_3BO_3 , 5 μM MnSO_4 , 3 μM ZnSO_4 , 0.7 μM

($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.7 μM CuSO_4 , 0.1 CoCl_2). Each day the nutrient solution was supplied automatically in an increasing volume as a function of the growth stages: 90, 120, 150, and 180 mL per plant at the start of the bolting, visible bud, flowering, and seed maturation stages, respectively.

The formation of mature seeds lasted 12 weeks after flowering. Siliques were harvested 2, 4, 6, 8 and 10 weeks after flowering (WAF). A class of siliques with a length comprise between 4 and 5.9 cm corresponding to the main class of siliques were dissected to separate silique envelopes (pericarps) and seeds. An aliquot of pericarps and seeds were directly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C to achieve proteomic analyzes while the rest of samples was freeze-dried, weighted for dry matter determination, and ground under fine powder in order to perform biochemical analyses.

D.II.2.b Quantification of N content

The total N content was determined in the pericarps and seeds during the beginning of silique development until the senescence i.e. 2, 4, 6, 8 and 10 weeks after flowering (WAF). The N quantification was performed using an elemental analyzer (EA3000, EuroVector, Milan, Italy) combined with a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (IRMS, IsoPrime GV Instruments, Manchester, UK).

D.II.2.c Profiling of active proteases

Soluble proteins were extracted from 200 mg of frozen pericarps with 1 mL of water and centrifuged 10 min at 13 000 g (4°C). Then, the protein concentrations were quantified by protein-dye staining (Bradford, 1976) using bovine serum albumin (BSA) as protein standard.

To detect active proteases, a fluorescent labelling of proteases was carried out, according to Poret *et al.* (2016). Protein extract (20 μg) was incubated in sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.5) containing 0.5 μM of MV201 (available in the laboratory), a specific fluorescent probe of papain-like cysteine proteases (PLCPs), and 2 mM dithiothreitol (mix final volume of 200 μL). In parallel, 20 μg of protein extract were incubated in Tris-base buffer (150 mM, pH 7.5) containing 0.5 μM of FP-Rh (available in the laboratory), a specific fluorescent probe for serine hydrolases (SHs), with a mix final volume of 200 μL . The two mixtures were incubated under gentle agitation for 4 h (for MV201) or 1 h (for FP-Rh) in the dark.

As control, equal volumes of soluble protein extracts from pericarps at 2, 4, 6, 8, 10 weeks after flowering were combined and 20 μg of the mix was treated as described above. In the No-Probe-Control (NPC), an equal volume of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added and competition experiments were also carried out consisting of the realization of pre-treatment for 30 min with 50 μM of E-64 (Sigma-Aldrich) for a competition with MV201 or DFP (Sigma-Aldrich) for a

competition with FP-Rh before adding probes (as described in [Poret et al., 2016](#)). Ice-cold acetone (1 mL) was added to precipitate the proteins and stop the reaction. The protein pellet was collected after centrifugation during 15 min at 16 000 *g* (4 °C), dissolved in 2X SDS-PAGE gel-loading buffer (140 mM sodium dodecyl sulfate, 200 mM Tris, 20% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 0.3 mM Bromophenol Blue), heated at 90°C for 10 min and separated on 12% SDS-PAGE gels. The fluorescence corresponding to the labelled proteins (i.e. the active proteases or serine hydrolases) was visualized by scanning the gels using a ProXPRESS 2D proteomic Imaging System (PerkinElmer; excitation wavelength: 532 nm; emission wavelength: 580 nm). Fluorescent signals were quantified by the software ImageJ. To control the protein quantity, gels were stained using Coomassie Brilliant Blue stain (0.5 g CBB G250, 10% acetic acid, 45% methanol in ultra-pure water (v/v)), destained (10% acetic acid, 40% methanol in ultra-pure water (v/v)) and scanned.

D.II.2.d Identification of active proteases

Protein extracts of pericarps (2, 4, 6, 8 and 10 weeks after flowering) were labelled with probes carrying a biotin tag that are available in the laboratory: DCG04 for PLCPs labelling or FP-biotin for SHs labelling. Then, a pull-down of biotinylated proteins was performed as described by [Poret et al. \(2016\)](#). Proteins (900 μ g) were labelled with 10 μ M of DCG04 or FP-biotin in labelling buffer (50 mM sodium acetate buffer, pH 5.5), 2 mM dithiothreitol for DCG04 or 50 mM Tris-buffer (pH 7.5) for FP-biotin. Samples were incubated at room temperature (4h for DCG04; 1h for FP-biotin) under agitation. As control, another aliquot was treated as described above but without probes (NPC, no probe control). According to [Chandrasekar et al. \(2014\)](#), after stopping the reaction, biotin-proteins were purified using streptavidin beads. Proteins were separated on 12% SDS-PAGE gels and detected by a silver nitrate staining ([Blum et al., 1987](#)). Bands of interest were excised manually and the trypsin digestion was performed according to [Girondé et al. \(2016\)](#).

The identification was performed by the proteomic platform from IFR MP 23 (University of Rouen Normandie, France). The protein bands of interest were excised from SDS-PAGE gels and were reduced at 50°C for 1 h with 10 mM dithiothreitol and alkylated for 1 hour in the dark with 55mM iodoacetamide. The gel fragments were washed several times with water and ammonium carbonate, dehydrated with acetonitrile and dried. Trypsin digestion of gel fragments was performed overnight with a dedicated automated system (MultiPROBE II, PerkinElmer) and followed by twice incubations for 15 min in acetonitrile solution to extract peptides from the gel pieces. Peptide extracts were then dried and dissolved in a buffer containing 3% acetonitrile and 0.1% formic acid for chromatographic elution. Peptides were enriched, separated and analysed using a 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS equipped with an HPLC-chip cube interface (Agilent Technologies, Massy, France). The fragmentation data were interpreted using the Mass Hunter

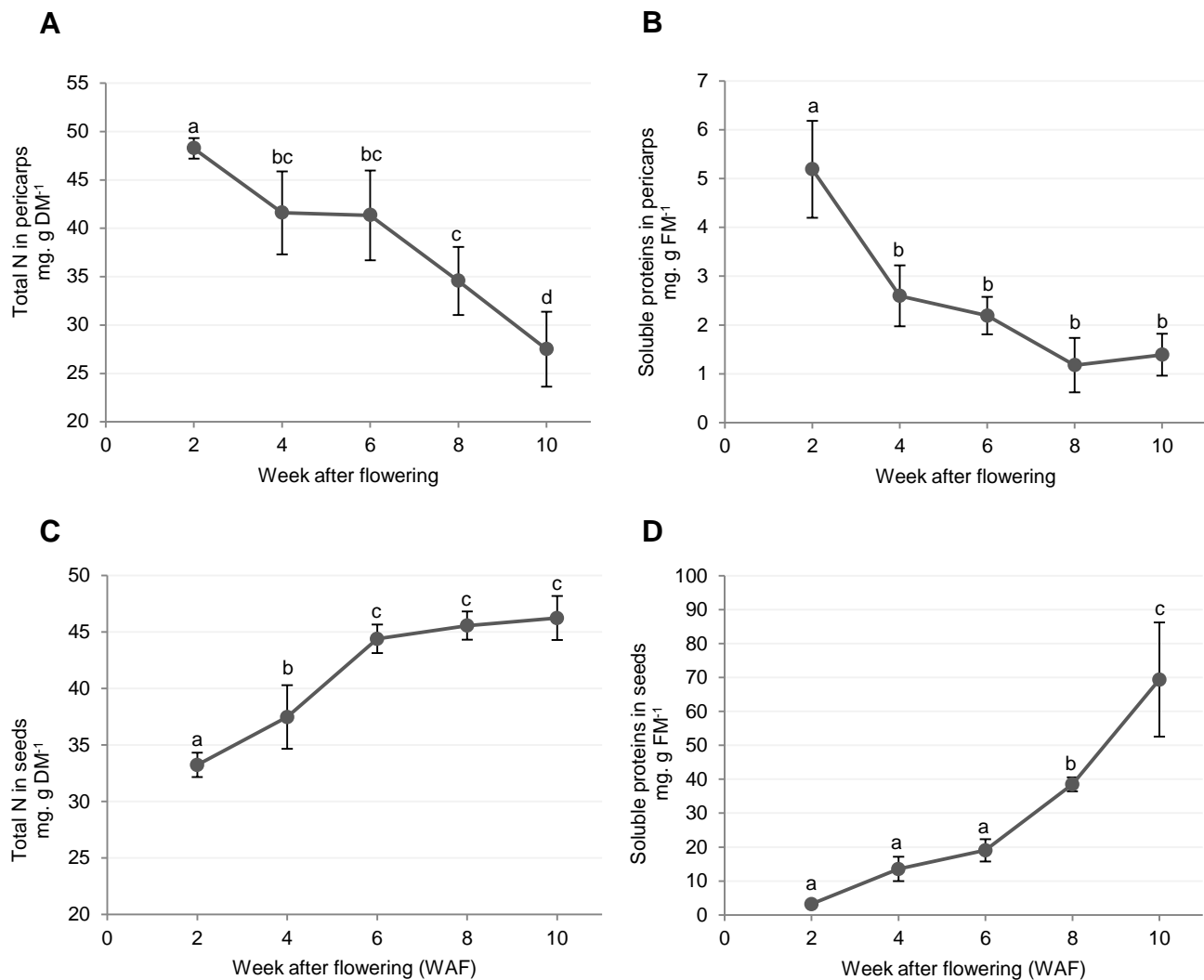


Figure D.II-1: Changes in total N and soluble protein contents during the senescence in pericarps (A, B) and seeds (C,D) of oilseed rape (cv. Aviso). Pericarps and seeds of oilseed rape siliques (cv. Aviso) were harvested 2, 4, 6, 8 and 10 weeks after flowering (WAF). Vertical bars correspond to \pm SD of the mean (n=3) and statistics are represented by letters ($p < 0.05$, ANOVA, Newman-Keuls test).

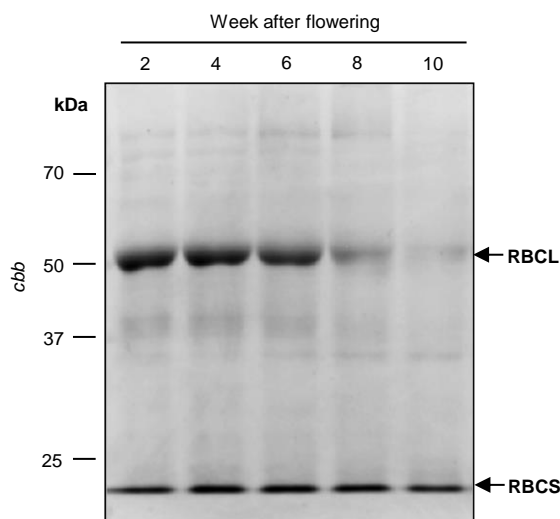


Figure D.II-2: Changes in RuBisCO quantity during the senescence in pericarps of oilseed rape (cv. Aviso). Soluble proteins of pericarps were extracted at 2, 4, 6, 8 and 10 weeks after flowering. Ten micrograms of soluble proteins were separated by SDS-PAGE 1D, stained by coomassie brilliant blue (cbb) and scanned. The presented gel is representative of three biological replicates. RBCL: large subunit of RuBisCO; RBCS: small subunit of RuBisCO.

software (version B.03.01, Agilent Technologies). For protein identification, MS/MS peak lists were extracted, converted into mzdata.xml format files and compared with the protein database (NCBIInr-Viridiplantae) using the MASCOT Daemon search engine (version 2.1.3; Matrix Science, London, UK). The searches were performed with no fixed modification and with variable modifications for oxidation of methionine, and with a maximum of two missed cleavage sites. MS/MS spectra were searched with a mass tolerance of 20 ppm for precursor ions and 0.6 Da for MS/MS fragments. Only peptides matching an individual ion score > 40 were considered. Proteins with two or more unique peptides matching the protein sequence were considered as a positive identification. The identified protein with the best match is provided with the GenBank accession number while other proteins recognized with the same peptides were also presented. Score, peptide matches, different peptide matches, experimental mass and theoretical mass are presented. The NCBI Blast Protein Database (algorithm blastp) was also used to compare protein sequences against sequences of *Brassicacea* proteins. The best results of blasts were presented with the name of the protein, the organism, the gene accession number and the percentage of sequence identity. PLCPs and SHs were ranked according to the classification of Richau *et al.* (2012) and the MEROPS database, respectively.

D.II.2.e Statistical analysis

The Ryan-Joiner test at 95 % was carried out to test the normality of the data. The software Microsoft® Excel 2010/XLStat® 2016 allowed comparing the data by analysis of variance (ANOVA) and Newman-Keuls test. The non-parametric test of Kruskal-Wallis was performed if the normality law of the data was not respected. Statistical significance was postulated at $P < 0.05$. For all measurements, three biological replicates were analysed ($n=3$, 1 replicate corresponding to a mix of 8-10 pericarps of siliques harvested on individual plant). All the data are presented as the mean \pm standard deviation (SD).

D.II.3. Results

D.II.3.a Changes of N and soluble proteins contents in pericarps and seeds during the different stages of silique development

The N and soluble proteins contents were quantified in kinetic during the monocarpic senescence to study the N remobilization from pericarps (**Figure D.II-1**). As expected, the N content decreased significantly in pericarps during senescence between 2 and 10 WAF (- 43%) (**Figure D.II-1A**). This decline was correlated with the increase of N content observed in seeds between 2 and 10 WAF (+ 39%) (**Figure D.II-1C**) with a pearson correlation coefficient at -0.8 (p-value <0.0001, data not shown). Moreover, soluble protein content was significantly reduced in pericarps (- 73%) between 2-10 WAF (**Figure D.II-1B**) while this content has been multiplied

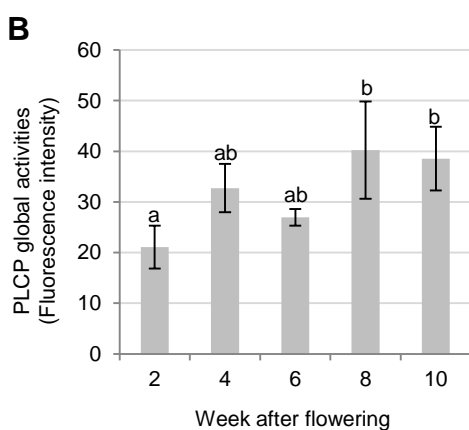
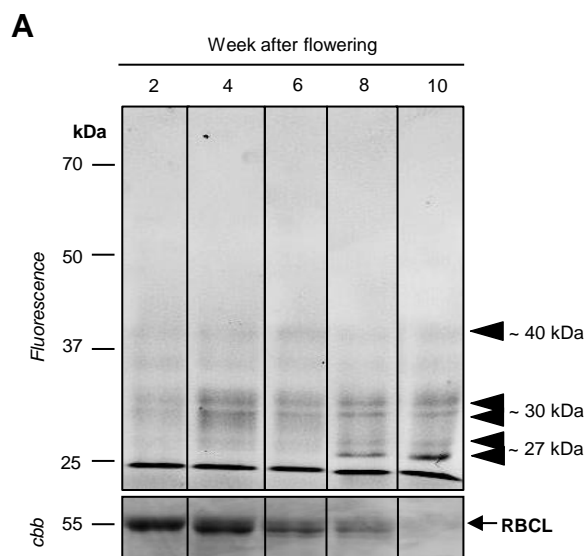


Figure D.II-3: PLCP activities at pH 5.5 during the senescence of pericarps in oilseed rape (cv. Aviso).

Soluble proteins of pericarps were extracted at 2, 4, 6, 8 and 10 weeks after flowering. A labelling of PLCP activities was performed with MV201 (specific fluorescent probe of PLCPs) and after SDS-PAGE, the fluorescence was scanned (**A**). The protein gel stained by coomassie brilliant blue (cbb) shows the total content of input proteins after incubation. Positions of active proteases were represented by black arrowheads. PLCPs global activity characterized by the fluorescence intensity was calculated by the software Image J® (**B**). The presented gel is representative of three biological replicates. Vertical bars correspond to the mean \pm SD ($n=3$). Letters represent the statistics ($p < 0.05$, ANOVA, Newman-Keuls test).

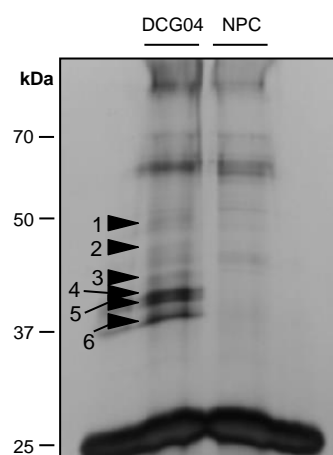


Figure D.II-4: Detection of PLCPs labelled with DCG04 in senescing pericarps of oilseed rape (cv. Aviso) at 10 weeks after flowering.

To characterize PLCPs previously observed (**Figure D.II-3**), a labelling of active proteases was performed by using the biotin-tagged probe DCG04. After SDS-PAGE, purified proteins were detected by staining with silver nitrate (for details see "Materials and Methods"). NPC corresponds to the no probe controls. Black arrowheads correspond to the excised zones.

by a factor of 21 in seeds (**Figure D.II-1D**). The decrease of soluble protein content in pericarps was significantly correlated with the increase of seed protein content ($r=-0.656$; p -value <0.001 , data not shown). As expected, in pericarps and seeds, the variations of N content were correlated with those of soluble protein content ($r=0.712$; $p = 0.003$ for pericarps and $r=0.783$; $p = 0.001$ for seeds). Moreover, the strong decrease of soluble protein in pericarps was reflected by the intense decrease of the large sub-unit of RuBisCO observed between 2 and 10 WAF (**Figure D.II-2**).

D.II.3.b Protease activity profiles in pericarps during silique senescence

To determine which proteases might be implicated in the degradation of soluble proteins during senescence of pericarps, a standard protease activity profiling of cysteine protease (using MV201, a specific fluorescent probe of papain-like cysteine proteases, PLCPs) and serine proteases (using FP-Rh, a specific fluorescent probe of serine hydrolases) was performed at pH 5.5 and 7.5 respectively on soluble protein extracts from pericarps at 2, 4, 6, 8 and 10 WAF (for details see section Materials and Methods). Labelling with MV201 allowed the detection of many active PLCPs during the senescence of pericarps (**Figure D.II-3A**). Indeed, active PLCPs were detected particularly at ~ 30 -35 and ~ 25 -30 kDa. Moreover, the total specific PLCPs activity was significantly increased (1.8 fold) between 2-10 WAF (**Figure D.II-3B**) and this was related to the apparition of an intense activity at ~ 27 kDa from 8 to 10 WAF. Finally, between 2 and 10 WAF, the increase of PLCPs activities was strongly associated with the decrease of RuBisCO abundance (**Figure D.II-3A**) and was significantly correlated with the decrease of N content ($r=-0.797$, $p <0.0001$) and soluble protein content in pericarps ($r=-0.703$, $p = 0.003$) (**Figures D.II-1A, D.II-1B**). In order to identify labelled PLCPs (**Figure D.II-3**), a pull-down of biotinylated proteins from pericarps at 10 WAF was performed by using an activity-dependent labelling with the biotin-tagged DCG04 probe (specific probe of PLCPs) (**Figure D.II-4, Table D.II-1**). The pull-down with DCG04 allowed detecting 6 bands of active PLCPs between 35 and 50 kDa (**Figure D.II-4**). These bands were manually excised and proteases were identified by LC-MS/MS (**Table D.II-1**) (for details see the section Materials and Methods). We identified 8 different actives PLCPs corresponding to 3 RD21-like, 2 SAG12-like, 2 Aleurain-like and 1 zingipain proteases according to the classification of Richau *et al.* (2012) (**Table D.II-1**). Unfortunately, active protease detected at 27 kDa (**Figure D.II-3**) was not purified with the pool-down using DCG04.

Many active serine hydrolases (SHs) were also detected with the labelling with FP-Rh during the senescence of pericarps (**Figure D.II-5A**). The total SHs specific activity was significantly increased (2.1 fold) between 2-10 WAF (**Figure D.II-5B**) and this was related to the increase of SHs activities at ~ 70 , ~ 50 , ~ 40 -34 and ~ 27 kDa. Moreover, between 2 and 10 WAF, the increase of SHs activities was associated with the decrease of RuBisCO level (**Figure D.II-5A**). Finally, as for PLCPs, the increase of the total SHs activity was significantly correlated with the decrease of

Table D.II-1: LC-MS/MS identification of PLCPs labelled with the biotin-tagged probe DCG04 in senescent pericarps of oilseed rape (cv. Aviso) at 10 week after flowering. To characterize PLCPs observed on the Figure D.II-2, a labelling with DCG04 was carried out followed by a pull-down of biotinylated proteins (Figure D.II-3). Detected zones were excised, treated and analyzed by LC-MS/MS. LC-MS/MS spectra were searched against the *Viridiplantae* database focused on oilseed rape using MASCOT 2.5.0. Only scores higher or equal to 40 were considered. The assigned protein of best match is provided alongside the GenBank accession number. Score, queries matched, peptide matches, different peptide matches, experimental mass and theoretical mass are presented. Others proteins identified in *Brassica napus* with the same peptides by MASCOT were also presented. Protein sequences were matched against sequences of Brassicacea proteins using the NCBI Blast Protein Database (algorithm blastp) and the best results of blasts are presented with the name of the protein, the organism, the gene accession number and the percentage of sequence identity. Finally, PLCPs were classified according to the classification of Richau *et al.* (2012).

zone (kDa)	Protein accession no [Brassica napus] / NCBI accession no.	Score	Queries Matched	Peptides matched	Different matched peptides	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Theo. pI	Others proteins identified with the same peptides by MASCOT	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [Brassica napus] / NCBI accession no. / % identity	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [Brassica napus] / NCBI accession no. / % identity	Class
1 (50)	BnaA10g05390D [Brassica napus] / gi 674926680	175	10	8	8	50452	50484.7	5.3	-	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica napus] / gi 923896233 / 97%	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922511911 / 98%	RD21-like
	BnaA08g04080D [Brassica napus] / gi 674916168	126	9	6	6	50625	50657.9	5.23	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923729007 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923844324	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923729007 / 99% ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923844324 / 96%	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922553936 / 96%	RD21-like
2 (50)	BnaA06g36920D [Brassica napus] / gi 674910774	87	9	5	5	50506	50539	5.57	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923652867 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923656414 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like isoform X1 [Brassica napus] / gi 923815285 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like isoform X2 [Brassica napus] / gi 923815292	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923652867 / 99%	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica rapa] / gi 685326917 / 99%	RD21-like
	BnaA10g05390D [Brassica napus] / gi 674926680	123	7	6	6	50452	50484.7	5.3	-	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica napus] / gi 923896233 / 97%	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922511911 / 98%	RD21-like
3 (50)	BnaA06g36920D [Brassica napus] / gi 674910774	41	4	3	3	50506	50539	5.57	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923652867 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923656414 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like isoform X1 [Brassica napus] / gi 923815285 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like isoform X2 [Brassica napus] / gi 923815292	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923652867 / 99%	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica rapa] / gi 685326917 / 99%	RD21-like

Table D.II-1: Continued

zone (kDa)	Protein accession no [Brassica napus] / NCBI accession no.	Score	Queries Matched	Peptides matched	Different matched peptides	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Theo. pI	Others proteins identified with the same peptides by MASCOT	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [Brassica napus] / NCBI accession no. / % identity	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [organism] / NCBI accession no. / % identity	Class
	BnaA06g36920D [Brassica napus] / gj 674910774	94	7	4	4	50506	50539	5.57	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gj 923652867 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gj 923656414 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like isoform X1 [Brassica napus] / gj 923815285 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like isoform X2 [Brassica napus] / gj 923815292	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gj 923652867 / 99%	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica rapa] / gj 685326917 / 99%	RD21-like
4 (45)	BnaA10g05390D [Brassica napus] / gj 674926680	72	4	4	4	50452	50484.7	5.3	-	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica napus] / gj 923896233 / 97%	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica oleracea var. oleracea] / gj 922511911 / 98%	RD21-like
	BnaC09g35690D [Brassica napus] / gj 674953141	68	9	6	5	39265	39290.4	5.57	-	thiol protease aleurain precursor [Brassica napus] / gj 937575257 / 97%	senescence-associated cysteine protease [Brassica oleracea] / gj 18141289 / 98%	AALP
	BnaA10g13210D [Brassica napus] / gj 674901420	64	8	5	5	39348	39450.7	5.46	thiol protease aleurain precursor [Brassica napus] / gj 937575257	BnaC09g35690D [Brassica napus] / gj 674953141 / 96%	PREDICTED: thiol protease aleurain [Brassica rapa] / gj 685374750 / 99%	AALP
	PREDICTED: senescence-specific cysteine protease SAG12-like [Brassica napus] / gj 923761352	34	2	2	2	38033	38057	6.99	senescence-specific cysteine protease [Brassica napus] / gj 5823018	senescence-specific cysteine protease [Brassica napus] / gj 5823018 / 99%	PREDICTED: senescence-specific cysteine protease SAG12 [Brassica oleracea var. oleracea] / gj 922428544 / 99%	SAG12-like
	BnaC01g26060D [Brassica napus] / gj 674965096	59	5	3	3	38107	38131.6	5.21	PREDICTED: zingipain-2-like [Brassica napus] / gj 923628655	PREDICTED: zingipain-2-like [Brassica napus] / gj 923628655 / 98%	PREDICTED: zingipain-2 [Brassica rapa] / gj 685262692 / 99%	Zingipain
	BnaA10g05390D [Brassica napus] / gj 674926680	47	4	4	4	50452	50484.7	5.3	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gj 923633918	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica napus] / gj 923896233 / 97%	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica oleracea var. oleracea] / gj 922511911 / 98%	RD21-like
5 (40)	BnaC09g35690D [Brassica napus] / gj 674953141	45	7	5	5	39265	39290.4	5.57	-	thiol protease aleurain precursor [Brassica napus] / gj 937575257 / 97%	senescence-associated cysteine protease [Brassica oleracea] / gj 18141289 / 98%	AALP
	senescence-specific cysteine protease [Brassica napus] / gj 5823018	43	3	3	3	38333	38357.5	6.99	-	PREDICTED: senescence-specific cysteine protease SAG12-like [Brassica napus] / gj 923761352 / 99%	PREDICTED: senescence-specific cysteine protease SAG12 [Brassica oleracea var. oleracea] / gj 922428544 / 98%	SAG12-like
6 (37)	senescence-specific cysteine protease [Brassica napus] / gj 5823018	43	5	3	3	38333	38357.5	6.99	PREDICTED: senescence-specific cysteine protease SAG12-like [Brassica napus] / gj 923761352	PREDICTED: senescence-specific cysteine protease SAG12-like [Brassica napus] / gj 923761352 / 99%	PREDICTED: senescence-specific cysteine protease SAG12 [Brassica oleracea var. oleracea] / gj 922428544 / 98%	SAG12-like

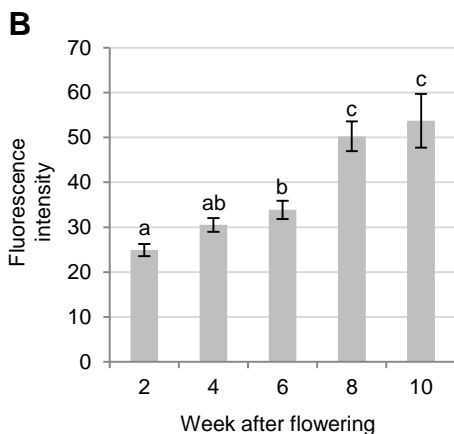
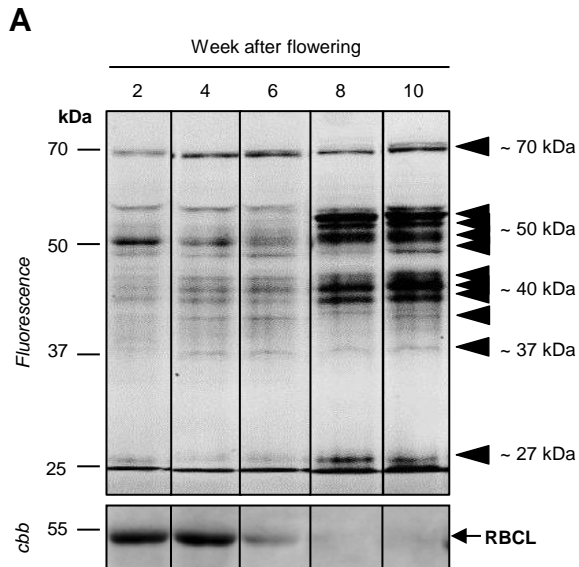


Figure D.II-5: Serine hydrolases activities at pH 7.5 during the senescence of pericarps in oilseed rape (cv. Aviso). Soluble proteins of pericarps were extracted at 2, 4, 6, 8 and 10 weeks after flowering. A labelling of serine hydrolase (SH) activities was performed with FP-Rh (specific fluorescent probe of SHs) (pH 7.5 ; 1h labelling). After SDS-PAGE, the fluorescence was scanned (**A**). The protein gel stained by coomassie brilliant blue (cbb) shows the total content of input proteins after incubation. Positions of active hydrolases were represented by black arrowheads. SHs global activity characterized by the fluorescence intensity was calculated by the software Image J® (**B**). The presented gel is representative of three biological replicates. Vertical bars correspond to \pm SD of the mean (n=3). Letters represent the statistics ($p < 0.05$, ANOVA, Newman-Keuls test).

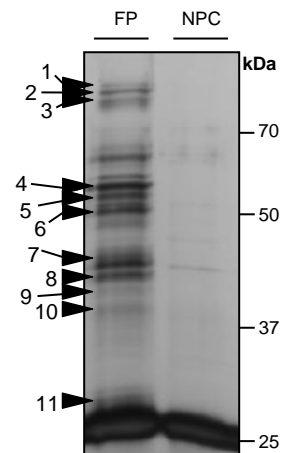


Figure D.II-6: Detection of SHs labelled with FP-biotin in senescing pericarps of oilseed rape (cv. Aviso) at 10 weeks after flowering. Serine hydrolases (SHs) previously observed (**Figure D.II-5**) were characterized by a labelling of active proteases using the biotin-tagged probe FP-biotin. After SDS-PAGE, purified proteins were detected by staining with silver nitrate (for details see "Materials and Methods"). NPC corresponds to the no probe controls. Black arrowheads correspond to the excised zones.

N content ($r=-0.804$, $p < 0.0001$) and soluble protein content ($r=-0.791$, $p < 0.0001$) in pericarps (**Figure D.II-1**). Then, in order to identify active SHs (**Figure D.II-5**), an activity-dependent labelling using the biotin-tagged FP-biotin probe (specific probe of SHs) was performed followed by a pull-down of biotinylated proteins at 10 WAF (**Figure D.II-6, Table D.II-2**). Many serine proteases were identified corresponding to 9 different subtilisin proteases (S8) and 7 different carboxypeptidases including a lysosomal carboxypeptidase (S10) (**Table D.II-2**). Moreover, several SHs were also identified as 1 phospholipase, 2 S-formylglutathione hydrolases, 2 pectin acetylsterases and 1 carboxylesterase.

D.II.4. Discussion

D.II.4.a The N remobilization from pericarps to seeds is associated with protein degradation

Mechanisms related to the N remobilization from pericarps to seeds of oilseed rape remains largely unknown. However, the improvement of N remobilization from pericarps to seeds corresponds to a promising way to improve the NUE in oilseed rape. In order to study the N remobilization from silique walls to seeds, the total N and the soluble protein contents were quantified in kinetic during the senescence of siliques (**Figure D.II-1**).

As already reported ([Hocking and Mason, 1993](#); [Milford et al., 1999](#); [Wagstaff et al., 2009](#)), our results showed that the N content decreased in pericarps and this was particularly correlated to the increase of N contents in seeds (**Figure D.II-1A-C**). The N remobilization from pericarps to seeds was also demonstrated in oilseed rape (cv. Aviso) by a ^{15}N experimentation during the monocarpic senescence ([Girondé et al., 2015b](#)). These results are also in agreement with a microarray study performed in pericarps of oilseed rape showing an up-regulation of 52 genes involved in the N transport during the period of seed filling ([Liu et al., 2015](#)).

Moreover, the decrease of N content was correlated with the degradation of soluble proteins in pericarps (**Figure D.II-1A-B**). This result was particularly expected because proteins represent more than 70-90% of reduced N in cells ([Peoples and Dalling, 1988](#)). In leaves, chloroplasts contain up to 70% of total foliar proteins ([Gan and Amasino, 1997](#)) and chloroplastic proteins correspond to main targets of proteases during leaf senescence ([Diaz-Mendoza et al., 2016](#)). Indeed, it was already shown that the degradation of the RuBisCO provides the major part of N needed to the development of growing organs ([Demirevska-Kepova et al., 2005](#); [Thoenen et al., 2007](#)). Similarly to leaves ([Zavaleta-Mancera et al., 1999](#); [Biswal et al., 2012](#); [Golczyk et al., 2014](#)), chloroplasts of pericarps were particularly degraded during senescence with the apparition of many plastoglobules ([Wagstaff et al., 2009](#)). That is why it may be possible that chloroplastic proteins also correspond to preferentially targets for proteases and could be particularly degraded during senescence of pericarps. In our study, this hypothesis seems to be confirmed by the intense degradation of the large sub-unit of RubisCO during the

Table D.II-2: LC-MS/MS identification of serine hydrolases (SHs) labelled with FP-biotin in senescent pericarps of oilseed rape (cv. Aviso) at 10 week after flowering. To characterize SHs observed on the Figure D.II-4, a labelling with FP-biotin was performed followed by a pull-down of biotinylated proteins (Figure D.II-6). Detected zones were excised, treated and analyzed by LC-MS/MS. LC-MS/MS spectra were searched against the *Viridiplantae* database focused on oilseed rape using MASCOT 2.5.0 and only scores higher or equal to 40 were considered. The assigned protein of best match is provided alongside the GenBank accession number. Score, queries matched, peptide matches, different peptide matches, experimental mass and theoretical mass are also presented. Others proteins identified in *Brassica napus* with the same peptides by MASCOT were also presented. Protein sequences were matched against sequences of Brassicaceae proteins using the NCBI Blast Protein Database (algorithm blastp) and better results of blasts are presented with the name of the protein, the organism, the gene accession number and the percentage of sequence identity. Finally, SHs were classified according to the MEROPS database.

zone (kDa)	Protein accession no [Brassica napus] / NCBI accession no.	Score	Queries Matched	Peptides matched	Different matched peptides	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Theo. pI	Others proteins identified with the same peptides by MASCOT	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [Brassica napus] / NCBI accession no. / % identity	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [organism] / NCBI accession no. / % identity	Class
1 (70)	BnaA09g24110D [Brassica napus] / gi 674939674	104	8	8	8	79996	80046.35	6.81	-	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: subtilisin-like protease SBT3.5 [Brassica napus] / gi 923710341 / 97%	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT5.3 [Brassica rapa] / gi 685360710 / 97%	Subtilisin S8
	BnaA09g07440D [Brassica napus] / gi 674914514	50	4	6	6	80011	80061.45	6.61	-	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica napus] / gi 923707124 / 98%	PREDICTED: subtilisin-like protease [Brassica rapa] / gi 685354526 / 98%	Subtilisin S8
	BnaCnng55020D [Brassica napus] / gi 674865926	39	2	2	2	79261	79310.97	8.4	-	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica napus] / gi 923688594 / 98%	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922567699 / 98%	Subtilisin S8
2 (70)	BnaA09g07410D [Brassica napus] / gi 674914517	152	19	13	13	79197	79246.24	5.83	-	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica napus] / gi 923688588 / 90%	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922556660 / 90%	Subtilisin S8
	BnaA09g07420D [Brassica napus] / gi 674914516	98	8	6	6	75963	76010.76	5.67	-	BnaCnng41800D [Brassica napus] / gi 674871280 / 93%	PREDICTED: subtilisin-like protease isoform X1 [Brassica rapa] / gi 685354528 / 91%	Subtilisin S8
	BnaA09g07440D [Brassica napus] / gi 674914514	77	5	5	5	80011	80061.45	6.61	-	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica napus] / gi 923707124 / 98%	PREDICTED: subtilisin-like protease [Brassica rapa] / gi 685354526 / 98%	Subtilisin S8
	BnaCnng55020D [Brassica napus] / gi 674865926	65	4	3	3	79261	79310.97	8.4	-	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica napus] / gi 923688594 / 98%	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922567699 / 98%	Subtilisin S8
	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica napus] / gi 923680866	45	5	3	3	79711			-	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica napus] / gi 923797271 ; PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica napus] / gi 923807510	PREDICTED: subtilisin-like protease [Brassica rapa] / gi 685331128 / 99%	Subtilisin S8
	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica napus] / gi 923707124	210	16	12	11	81616	81667.26	6.64	-	BnaA09g07440D [Brassica napus] / gi 674914514 / 98%	PREDICTED: subtilisin-like protease [Brassica rapa] / gi 685354526 / 99%	Subtilisin S8
3 (70)	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica napus] / gi 923688588	138	15	11	11	80278	80328.6	6.23	-	BnaCnng28690D [Brassica napus] / gi 674876868 / 92%	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922556660 / 97%	Subtilisin S8
	BnaCnng55020D [Brassica napus] / gi 674865926	99	9	7	7	79261	79310.97	8.4	-	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica napus] / gi 923688594 / 98%	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922567699 / 98%	Subtilisin S8
	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica napus] / gi 923682725	85	8	6	6	73353	73398.89	7.57	-	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica napus] / gi 923688592 / 100%	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922567705 / 99%	Subtilisin S8
	BnaA09g07410D [Brassica napus] / gi 674914517	69	6	5	5	79197	79246.24	5.83	-	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica napus] / gi 923688588 / 90%	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922556660 / 90%	Subtilisin S8
	BnaC01g10960D [Brassica napus] / gi 674934002	40	2	2	2	-	45877.84	7.2	-	PREDICTED: phospholipase A1-IIgamma-like [Brassica napus] / gi 923736152 / 92%	PREDICTED: phospholipase A1-IIgamma [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922412808 / 91%	-

Table D.II-2: Continued

zone (kDa)	Protein accession no [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no.	Score	Queries Matched	Peptides matched	Different matched peptides	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Theo. pI	Others proteins identified with the same peptides by MASCOT	Result of BLAST Protein [<i>Brassica napus</i>]-Protein [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no. / % identity	Result of BLAST Protein [<i>Brassica napus</i>]-Protein [<i>organism</i>] / NCBI accession no. / % identity	Class
5 (50)	BnaC03g35940D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674925286	37	3	3	3	45840	45870.13	6.06	PREDICTED: pectin acetyltransferase 5-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923792005	PREDICTED: pectin acetyltransferase 5-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923792005 / 99%	PREDICTED: pectin acetyltransferase 5-like [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922441462 / 99%	PAE
	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923844617	32	3	3	3	54114	54148.29	6.83	-	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923888443 / 96%	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922568661 / 99%	S10
6 (50)	PREDICTED: pectin acetyltransferase 7-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923895530	121	9	6	6	42154	42181.52	9.32	-	PREDICTED: pectin acetyltransferase 7 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923507686 / 95%	PREDICTED: pectin acetyltransferase 7-like [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922451736 / 100%	PAE
	BnaA06g19010D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674894935	106	6	5	5	35528	35550.37	5.16	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923844667	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923844667 / 98%	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685320048 / 99%	CXE
7 (50-37)	BnaA03g19510D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674897491	114	11	6	6	31869	31888.93	6.24	-	PREDICTED: S-formylglutathione hydrolase [<i>Brassica napus</i>] / gi 923544622 / 99%	PREDICTED: S-formylglutathione hydrolase [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922431452 / 99%	-
	BnaA01g06330D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674904822	80	5	2	2	53488	53521.41	5.43	BnaA01g06320D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674904823 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923505359 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923505363 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923923220	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923505363 / 99%	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685257732 / 98%	S10
	BnaC04g01950D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674909212	55	8	4	4	31524	31544.48	5.84	-	PREDICTED: S-formylglutathione hydrolase-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923622215 / 98%	PREDICTED: S-formylglutathione hydrolase-like [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685304077 / 97%	-
	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923844617	40	5	4	4	54114	54148.29	6.83	-	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923888443 / 96%	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922568661 / 99%	S10
	BnaA04g07190D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674893092	39	5	4	4	56619	56655.77	6.21	BnaC04g29380D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674899250 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 20 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923826505	BnaC04g29380D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674899250 / 99%	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 20 [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685297745 / 97%	S10
8 (50-37)	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923923220	131	12	7	7	53413	53447.24	5.28	-	BnaA01g06330D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674904822 / 98%	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922418008 / 99%	S10
	BnaA01g06330D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674904822	114	11	7	5	53488	53521.41	5.43	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923505363	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923505363 / 99%	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685257732 / 98%	S10
	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923844617	45	3	3	3	54114	54148.29	6.83	-	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923888443 / 96%	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922568661 / 99%	S10
	BnaA04g07190D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674893092	32	4	3	3	56619	56655.77	6.21	BnaC04g29380D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674899250 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 20 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923826505	BnaC04g29380D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674899250 / 99%	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 20 [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685297745 / 97%	S10

Table D.II-2: Continued

zone (kDa)	Protein accession no [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no.	Score	Queries Matched	Peptides matched	Different matched peptides	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Theo. pI	Others proteins identified with the same peptides by MASCOT	Result of BLAST Protein [<i>Brassica napus</i>]-Protein [NCBI accession no. / % identity	Result of BLAST Protein [<i>Brassica napus</i>]-Protein [organism] / NCBI accession no. / % identity	Class
9 (50-37)	BnaA01g06330D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674904822	70	4	3	3	53488	53521.41	5.43	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923505363 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923923220	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923505363 / 99%	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685257732 / 98%	S10
10 (50-37)	PREDICTED: lysosomal Pro-X carboxypeptidase-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923647110	40	3	3	3	57149	57185.35	4.94	PREDICTED: lysosomal Pro-X carboxypeptidase-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923647460	PREDICTED: lysosomal Pro-X carboxypeptidase-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923647460 / 97%	PREDICTED: lysosomal Pro-X carboxypeptidase [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922431562 / 99%	S10
	BnaA01g06330D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674904822	163	18	6	6	53488	53521.41	5.43	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923505363 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923923220	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923505363 / 99%	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685257732 / 98%	S10
11 (25)	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 20 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923826505	81	6	3	3	57750	57787.39	6.32	-	BnaC04g29380D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674899250 / 92%	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 20 isoform X1 [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922459834 / 99%	S10
	BnaA10g23100D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674963729	69	7	5	5	53907	53941.01	6.43	-	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923888443 / 99%	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685379438 / 99%	S10
	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923844617	44	5	3	3	54114	54148.29	6.83	-	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923888443 / 96%	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922568661 / 99%	S10

monocarpic senescence in pericarps (**Figure D.II-2**). Moreover, it was already shown that many genes encoding for amino acid transporters were up-regulated during senescence of pericarps in oilseed rape (Tan *et al.*, 2016) and *Arabidopsis thaliana* (Wagstaff *et al.*, 2009) and these results are consistent with the strong proteolysis observed during senescence of pericarps.

D.II.4.b Cysteine and serine proteases activities are associated with proteolysis during senescence of pericarps.

Our results showed that many active cysteine proteases (PLCPs) were detected during the pericarp senescence particularly at ~30-35 and ~25-30 kDa and that the total specific PLCPs activity was also significantly increased (**Figure D.II-3**). Moreover, this was correlated with the decrease of total N and soluble protein contents (**Figure D.II-1**). These results are consistent with the up-regulation of many genes encoding for PLCPs observed in pericarps of *Arabidopsis thaliana* during senescence (Wagstaff *et al.*, 2009).

In the present study, 8 active PLCPs corresponding to 3 RD21-like, 2 SAG12-like, 2 Aleurain-like (AALP) and 1 zingipain proteases (according to the classification of Richau *et al.* (2012)) were identified in senescing pericarps (**Table D.II-1**). Interestingly, several RD21-, SAG12- and Aleurain-like proteases were also identified during senescence of oilseed rape leaves subjected to N limitation (cv. Aviso; Poret *et al.*, 2016) while one RD21-like protease (BnaA10g05390D [*Brassica napus*] / gi|674926680) was identified in both type of senescence. Moreover, during senescence of oilseed rape leaves induced by N limitation, a high activity of PLCPs was also detected at 27 kDa corresponding to RD21-, SAG12-, XBCP3- and AALP-like proteases (cv. Aviso, Poret *et al.*, 2016). That is why the strong activity detected in senescent pericarps at 27 kDa could correspond to the same type of PLCPs. Finally, these results were also consistent with the up-regulation of genes encoding RD21, SAG12 and AALP like proteases observed during pericarp senescence in *Arabidopsis thaliana* (Wagstaff *et al.*, 2009). Altogether, these results demonstrated that PLCPs as RD21-, SAG12- and AALP- proteases could play a crucial role in the proteolysis associated with pericarp senescence as demonstrated during leaf senescence in oilseed rape and pericarp senescence in *Arabidopsis thaliana*.

Serine proteases correspond to the larger class of proteases in plants with more than 200 members identified in the genome of *Arabidopsis thaliana* (Tripathi and Sowdhamini, 2006; van der Hoorn, 2008; Roberts *et al.*, 2012). Previous studies have shown the strong implication of serine proteases during leaf senescence of oilseed rape (Girondé *et al.*, 2016; Poret *et al.*, 2016). Consequently, one objective of the present study was to characterize the role of serine proteases in the proteolysis and N remobilization during pericarp senescence. Results showed that the total activity of serine hydrolases (SHs) was significantly increased and related to the activities of proteins at ~70, ~50, ~40-34 and ~27 kDa during the senescence of pericarps (**Figure D.II-5**). Moreover, this was associated to decrease of RuBisCO quantity and correlated with the

decrease of total N and soluble proteins contents (**Figures D.II-1 and 2**). It was already shown that genes encoding serine proteases were up-regulated during the pericarp senescence of *Arabidopsis thaliana* (Wagstaff *et al.*, 2009).

Using FP-biotin labelling method, we have identified 9 active subtilisin proteases (S8) and 7 active carboxypeptidases including a lysosomal carboxypeptidase (S10) (**Table D.II-2**). Interestingly, several subtilisin proteases (S8) proteases were also identified during senescence of oilseed rape leaves subjected to N limitation (cv. Aviso; Poret *et al.*, 2016) and 2 of these were also identified in pericarps during senescence (BnaA09g07410D [*Brassica napus*] / gi|674914517; BnaCnng55020D [*Brassica napus*] / gi|674865926). These results are in agreement with several studies showing the increase of subtilisin-like proteases activities during pericarp senescence (Tran *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2015). Indeed, activities of caspase-like proteases as subtilisins in pericarps were detected during the maturation of barley pericarps (Tran *et al.*, 2014). Moreover, using zymograms experiments, Martínez *et al.* (2015) observed the increase of the activity of AtSASP (a subtilisin protease) in senescent pericarps of *Arabidopsis thaliana* compared to young pericarps. Otherwise, several genes encoding carboxypeptidases were up-regulated during pericarp senescence in *Arabidopsis thaliana* (Wagstaff *et al.*, 2009) while activities of many carboxypeptidases were also detected during the sequential senescence in leaves of oilseed rape in response to a N limitation (Poret *et al.*, submitted (§ D.III)). Overall results proved that serine proteases play an important role during senescence processes including pericarp senescence.

D.II.5 Conclusion

Genotypic studies of oilseed rape showed that genotypes presenting the higher NRE and seed yield were characterized by a stronger N remobilization from pericarps (Balint and Rengel, 2011; Girondé *et al.*, 2015b). This means that the optimization of N remobilization from pericarps to seeds may represent a promising way to improve the NUE of oilseed rape. In this study, we observed that N remobilization seems to be related to an efficient degradation of soluble proteins in senescing pericarps. Moreover, the large proteolysis observed during pericarp senescence appears to be associated with the increase of CPs activities including RD21-, SAG12-, AALP-like proteases activities but also serine protease activities including subtilisin and carboxypeptidases. In *Arabidopsis thaliana*, Wagstaff *et al.* (2009) showed that genes encoding aspartic and metallo-proteases were induced during the pericarp senescence. That is why further investigations of activities from other proteases classes may allow to better understand protein degradation and N remobilization associated with pericarp senescence in oilseed rape. Finally, to improve the NUE of oilseed rape *via* the optimization of NRE, this study suggests that it will be necessary to explore the genotypic variability of oilseed rape in order to select

genotypes presenting high protease activities during both leaf sequential and pericarp senescence.

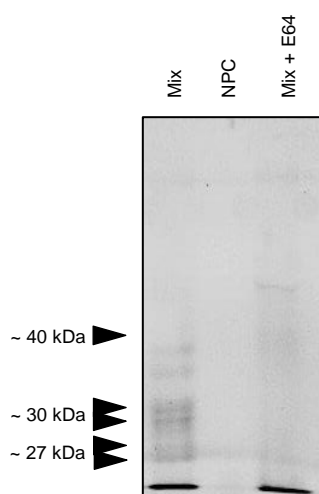
Supplemental material

Supplementary Figure D.II-1: Controls for PLCP activities at pH 5.5 and SHs activities at pH 7.5 during the senescence of pericarps of *Brassica napus* L. (cv. Aviso). Soluble proteins of pericarps of *Brassica napus* L. (cv. Aviso) were extracted at 2, 4, 6, 8 and 10 weeks after flowering. The labelling of PLCP and serine protease activities were performed with MV201 (specific fluorescent probe of PLCPs; pH 5.5; 4h labelling) or FP-Rh (specific probe of serine hydrolases; pH 7.5 ; 1h labelling) (see **Figures D.II-3 and D.II-5**). Mix corresponds to a mixture of protein extracts from pericarps at 2, 4, 6, 8 and 10 weeks after flowering in the presence of the probe MV201 or FP-Rh. NPC : no probe control (absence of MV201 or FP-Rh). Mix+E64: mix and E64 (specific inhibitor of cysteine proteases). Mix+DFP: mix and DFP (specific inhibitor of serine proteases). After SDS-PAGE, the fluorescence was scanned.

Acknowledgements

This work was funded by the French National Research Agency (ANR-11-BTBR-004 RAPSODYN - Investments for the Future: Optimisation of the RApSeed Oil content and Yield under low Nitrogen input) and by a Ph.D. grant to Mrs Marine Poret from the French Ministry of Research and the PhD Doctoral School (EDNBISE, Ecole Doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement). Further financial support was provided by ERA-IB project "PRODuCE", the Max Planck Society, COST CM1004 and the University of Oxford. The authors would like to thank Dr. Nathalie Nési, INRA (UMR 1349 Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, INRA, Agrocampus Ouest, Université de Rennes) who is the leader of this ANR-program, Dr Laurent Coquet for protein identification by ESI LC-MS/MS on the proteomic platform at the University of Rouen Normandie (Pissaro platform, IFR MP 23, Rouen, France and finally the UMR EVA technical staff for their skillful assistance. We are most grateful to PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) core facility for all element and isotope analysis used in this study. The authors also wish to acknowledge Dr Laurence Cantrill for proofreading and English correction. The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

A. MV201



B. FP-Rh

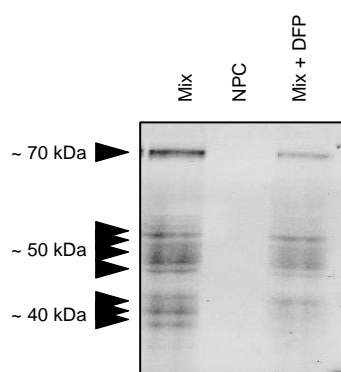


Figure D.II-S1: Controls for PLCP activities at pH 5.5 and SHs activities at pH 7.5 during the senescence of pericarps of *Brassica napus* L. (cv. Aviso)

Soluble proteins of pericarps of *Brassica napus* L. (cv. Aviso) were extracted at 2, 4, 6, 8 and 10 weeks after flowering. The labelling of PLCP and serine protease activities were performed with MV201 (specific fluorescent probe of PLCPs; pH 5.5 ; 4h labelling) or FP-Rh (specific probe of serine hydrolases ; pH 7.5 ; 1h labelling) (see Figures D.II-3 and D.II-5). Mix corresponds to a mixture of protein extracts from pericarps at 2, 4, 6, 8 and 10 weeks after flowering in the presence of the probe MV201 or FP-Rh. NPC : no probe control (absence of MV201 or FP-Rh). Mix+E64: mix and E64 (specific inhibitor of cysteine proteases). Mix+DFP: mix and DFP (specific inhibitor of serine proteases). After SDS-PAGE, the fluorescence was scanned.

Chapitre D : Résultats

Chapitre D.III. Une comparaison génotypique révèle que l'efficacité de remobilisation de l'azote durant la sénescence foliaire est associée à des activités protéasiques et une balance phytohormonale spécifiques chez le colza d'hiver

Contexte : Le colza (*Brassica napus* L.) est une plante oléagineuse dont la culture aboutit à de nombreux débouchés alimentaires et non alimentaires. Afin d'atteindre un rendement satisfaisant, le colza nécessite une quantité importante d'engrais azotés. Cette culture présente néanmoins une faible efficacité d'usage du N (EUA) qui est principalement associée à une faible Efficacité de Remobilisation de l'Azote (ERA) durant la sénescence foliaire de type séquentielle observée lors des stades végétatifs. Par ailleurs, une étude récente a démontré qu'une forte remobilisation du N est associée à une dégradation efficace des protéines lors de la sénescence foliaire (Girondé *et al.*, 2015a).

Objectif : Afin d'améliorer l'ERA chez le colza, le premier objectif était de caractériser les principaux mécanismes protéolytiques associés à la sénescence séquentielle chez deux génotypes présentant des ERA différentes. De plus, comme la sénescence est particulièrement régulée par les phytohormones, les différences putatives d'activités protéasiques entre ces deux génotypes pourraient être associées à une régulation différente de la sénescence par les phytohormones. Ainsi, le second objectif était de comparer l'évolution des teneurs en phytohormones entre ces deux génotypes au cours de la sénescence afin de les corréliser avec les variations d'activités protéasiques.

Démarche expérimentale : Les changements biochimiques, les modifications des activités protéasiques et des teneurs en phytohormones ont été étudiés en cinétique au sein d'une feuille mature entrant en sénescence. Cette étude est menée chez deux génotypes de colza (Ténor et Samouraï) présentant des ERA contrastées, cultivés en serre au stade rosette et soumis ou non à une limitation en nitrate.

Résultats : Par rapport au génotype Samouraï (faible ERA), le génotype Ténor présentant une meilleure ERA est caractérisé par une dégradation supérieure des protéines solubles particulièrement en condition de limitation en N. Cette protéolyse efficace est associée à (i) l'augmentation des activités des protéases à sérine et à cystéine et (ii) l'apparition de nouvelles activités des protéases à cystéine (RD21-like, cathepsine B, SAG12-like, RD19-like, XBCP3-like et aleurain-like protéases) pendant la sénescence induite par une limitation en N. De plus, par rapport à Samouraï, le génotype Ténor est caractérisé par un fort ratio hormonal ([acide salicylique] + [acide abscissique]) / ([cytokinines]) régulant positivement la sénescence particulièrement lors d'une limitation en N. Ce ratio élevé peut être corrélé à la plus forte dégradation des protéines et à l'activité plus intense des protéases à sérine et à cystéine au cours de la sénescence chez ce génotype.

D.III. A genotypic comparison reveals that the improvement in nitrogen remobilization efficiency in oilseed rape leaves is related to specific patterns of senescence-associated protease activities and phytohormones

Marine Poret^{1,2,3}, Balakumaran Chandrasekar^{4,5}, Sylvain Déchaumet⁶, Alain Bouchereau⁶, Tae-Hwan Kim^{2,7}, Bok-Rye Lee^{2,7}, Renier A. L. van der Hoorn⁴, Jean-Christophe Avice^{1,2,3*}.

¹ Université de Caen Normandie, F-14032 Caen, France

² UCN, UMR INRA–UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France, F-14032 Caen, France

³ INRA, UMR INRA–UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France

⁴ The Plant Chemetics Laboratory, Department of Plant Sciences, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3RB, United Kingdom

⁵ The Plant Chemetics Laboratory, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Carl-von-Linne Weg 10, 50829 Cologne, Germany

⁶ INRA, UMR 1349 Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, INRA, Agrocampus Ouest, Université de Rennes 1, F-35653 Le Rheu, France

⁷ Department of Animal Science, Institute of Agricultural Science and Technology, College of Agriculture and Life Science, Chonnam National University, Gwangju, South Korea

Running title: Protease activities and phytohormone patterns related to efficient leaf N remobilization during senescence

Abstract

Oilseed rape (*Brassica napus* L.) is an oleoproteaginous crop characterized by low Nitrogen Remobilization Efficiency (NRE) during the sequential leaf senescence of the vegetative stages, and this leads to poor N use efficiency (NUE). To improve the NRE, the objective was to characterize key senescence-associated proteolytic mechanisms capable of distinguishing genotypes with contrasting NRE. To reach this goal, biochemical changes, protease activities and phytohormone patterns were studied in mature leaves undergoing senescence in two genotypes with contrasting NRE cultivated in a greenhouse under limiting or ample nitrate supply. Investigations showed that the genotype with the higher NRE (Ténor) possessed enhanced senescence processes in response to nitrate limitation, and this led to greater degradation of soluble proteins compared to the other genotype (Samouraï). This efficient proteolysis is associated with (i) an increase in serine and cysteine protease activities and (ii) the appearance of new cysteine protease activities (RD21-like, cathepsin-B, SAG12-like, RD19-like, XBCP3-like and aleurain-like proteases) during senescence induced by N limitation. Compared to Samouraï, Ténor has a higher hormonal ratio $([\text{salicylic acid}] + [\text{abscisic acid}]) / ([\text{cytokinins}])$ that promotes senescence, particularly under low N conditions, and this is correlated with the stronger protein degradation and serine/cysteine protease activities observed during senescence.

Short statement: The improvement in N recycling during leaf senescence in a genotype of *Brassica napus* L. characterized by a high nitrogen remobilization efficiency is related to a high phytohormonal ratio ([salicylic acid] + [abscisic acid]) / ([cytokinins]) that promotes leaf senescence and is correlated with an increase or the induction of specific serine and cysteine protease activities.

Keywords: *Brassica napus* L., nitrogen remobilization efficiency, senescence, protease activity, senescence-associated proteases, phytohormones

Abbreviations:

AALP, aleurain-like protease; ABA, abscisic acid; AP, aspartic protease; CP, cysteine protease; CXE, carboxylesterase; HN, high nitrate; IAA, indole acetic acid, auxin; IP, isopentenyladenine; IPR, isopentenyladenosine; JA, jasmonic acid; LN, low nitrate; MeJA, methyl jasmonate; MES, methylesterase; MP, metalloprotease; N, nitrogen; NPC, no probe control; NRE, nitrogen remobilization efficiency; NUE, nitrogen use efficiency; PAE, pectinacetylerase; PLCP, papain-like cysteine protease; POPL, prolyloligopeptidase-like protease; RuBisCO, ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase; RBCL, large subunit of RuBisCO; SA, salicylic acid; SAP, senescence associated protease; SCPL, serine carboxypeptidase-like protein; SP; serine protease; VPE, vacuolar processing enzyme

D.III.1 Introduction

The increase in crop productivity during the last five decades is due particularly to an increase in nitrogen (N) fertilizer inputs (Glass, 2003) in relation to improvements in genetic performance and culture practices. Nevertheless, N fertilizers represent the most costly inputs in crop production (Rothstein, 2007) and their widespread use substantially increases the risk of N pollution. That is why a reduction in N inputs has become a priority for reducing the economic environmental costs in a context of sustainable agriculture (Behrens *et al.*, 2001).

While oilseed rape (*Brassica napus* L.) is the dominant oleoproteaginous crop in northern Europe, it has a high demand for N fertilizers (160-250 kg N ha⁻¹ year⁻¹) to attain a satisfactory seed yield (Rathke *et al.*, 2005). Despite a considerable capacity to absorb N (Lainé *et al.*, 1993), the N use efficiency (NUE) of winter oilseed rape is lower than other crop plants such as wheat or barley (Sylvester-Bradley *et al.*, 2009). Indeed, only 50% of the N originating from fertilizers is recovered in the seeds while a significant proportion is returned to the environment (Schjoerring *et al.*, 1995) leading to a negative economic and agro-environmental balance for oilseed rape. Several studies have proved that this weak NUE is mainly due to a poor N Remobilization Efficiency (NRE) during the 'sequential' leaf senescence that occurs in the vegetative stages and during the transition between vegetative and reproductive phases of

development in oilseed rape (Malagoli *et al.*, 2005a, b; Gombert *et al.*, 2006; Avice et Etienne, 2014). Indeed, a recent screening of NUE, NRE and senescence processes in ten genotypes of oilseed rape defined 4 genotypic profiles with different behaviours during vegetative-stage senescence that were associated with N limitation (Girondé *et al.*, 2015a). These authors showed that genotypes with the highest N use efficiency were also characterized by an efficient NRE.

Sequential senescence gradually affects older leaves along the axis of the plant and leads to nutrient remobilization from the source leaves to the young leaves and other sink organs (Guiboileau *et al.*, 2010; Avice et Etienne, 2014). Leaf senescence is tightly linked to global plant productivity and the seed crop yield (Wu *et al.*, 2012; Gregersen *et al.*, 2013), especially in response to low N fertilization. This is a complex process controlled by endogenous and environmental factors (Guo *et al.*, 2005; Kusaba *et al.*, 2013). Among the endogenous factors that are able to modulate the progression of senescence, it is well established that leaf senescence can be induced, delayed or suppressed by phytohormones (Jibrán *et al.*, 2013; Zhang et Zhou, 2013; Khan *et al.*, 2014). Indeed, cytokinins and gibberellins are known to decelerate senescence processes (Gan et Amasino, 1995 (*Nicotiana tabacum*); Yu *et al.*, 2009a (*Paris polyphylla*)) while ethylene, jasmonic acid, abscisic acid and salicylic acid are known to promote and accelerate leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* (Morris *et al.*, 2000; He *et al.*, 2001; Jing *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2012). Moreover, some altered senescence phenotypes occur after the alteration of phytohormone signalling. For example, AZF2 encodes for a Cys2/His2 type zinc finger protein and its transcript level was up-regulated by abscisic acid, while a loss-of function of AZF2 delayed natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* (Li *et al.*, 2012). It was also recently reported that the overexpression of a cytokinin biosynthesis gene (isopentenyltransferase) in transgenic canola (*Brassica napus* L.) led to a delay in leaf senescence and improved the seed yield under both rainfed and irrigated conditions (Kant *et al.*, 2015).

Finally, when leaf senescence is initiated, it leads to molecular and physiological events such as chloroplast breakdown, as well as oxidation and hydrolysis of macromolecules such as lipids, nucleic acids and proteins (Krupinska *et al.*, 2012; Avice et Etienne, 2014; Kim *et al.*, 2016). The breakdown and particularly the hydrolysis of soluble proteins like RuBisCO (ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase, EC 4.1.1.39) are the most important degradation processes during leaf senescence. In the context of reducing N fertilizers, this recycling of N compounds from source leaves is crucial to satisfy the N demand of growing organs (Demirevska-Kepova *et al.*, 2005; Thoenen *et al.*, 2007; Diaz *et al.*, 2008). It has been demonstrated that the optimization of NRE in oilseed rape is highly related to soluble protein degradation and the improvement of RuBisCO recycling by proteases during leaf senescence (Desclos-Théveniau *et al.*, 2014; Girondé *et al.*, 2015a). Protein degradation during senescence is associated with the activity of several

protease classes such as aspartic proteases (APs), metalloproteases (MPs), serine proteases (SPs), cysteine proteases (CPs) and the proteasome (Roberts *et al.*, 2012). In oilseed rape leaves, N limitation leads to an increase in AP activity during the first phases of senescence [Desclos *et al.*, 2009 (cv. Capitol), Girondé *et al.*, 2016 (cv. Aviso)]. Moreover, Poret *et al.* (2016) have demonstrated that AP activities remain stable until the late stages of leaf senescence in oilseed rape (cv. Aviso). MPs and the proteasome have also been implicated in leaf senescence. Indeed, proteomic analyses showed that a chloroplastic FtsH and the catalytic β 1 subunit of the proteasome were induced in oilseed rape during leaf senescence (Desclos *et al.*, 2009 (cv. Capitol)). Moreover, the global activity of the proteasome remains stable until the end of leaf senescence in oilseed rape (Poret *et al.*, 2016 (cv. Aviso)). During leaf senescence, the global activity of SPs is also increased in oilseed rape (cv. Aviso) particularly in response to N limitation, and has been associated with several active SPs such as subtilisins (S8) and prolyloligopeptidase-like proteases (S9) (Poret *et al.*, 2016). As reported for other species (Bhalerao *et al.*, 2003 (*Populus tremula*); Guo *et al.*, 2004 (*Arabidopsis thaliana*)), the CP class corresponds to the most abundant class of up-regulated proteases during leaf senescence and seems to be crucial for the degradation of soluble proteins in oilseed rape. A recent study showed that some papain-like cysteine proteases (PLCPs) and vacuolar processing enzymes (VPEs) were present in mature leaves and their activity increased during leaf senescence, particularly under low N conditions (Poret *et al.*, 2016 (cv. Aviso)). In addition, new CP activities were detected during senescence, especially under nitrate limitation and they corresponded to the activities of RD21-like proteases, SAG12-like proteases, XBCP3-like proteases and aleurain-like proteases (Poret *et al.*, 2016 (cv. Aviso)).

As proteolysis efficiency is essential for the improvement of NRE in leaves of oilseed rape, the genotypic variability of leaf NRE observed by Girondé *et al.*, (2015a) in response to N limitation could be linked to contrasted protease activities during leaf senescence. Based on this hypothesis, our first goal was to characterize and compare the senescence-associated protease activities of two genotypes (Ténor and Samouraï) previously identified with contrasting NREs (Girondé *et al.*, 2015a). Ténor, unlike Samouraï, is able to maintain its leaf biomass production in response to low N supply and this is essentially due to its comparatively greater degradation of soluble proteins in source leaves (Girondé *et al.*, 2015a). Moreover, because senescence is tightly controlled by endogenous phytohormones, the putative genotypic differences in protease activities have been hypothesized as being associated with differential regulation of senescence by the phytohormones. In order to verify this assumption, our second objective was to compare the phytohormone contents between the two genotypes during leaf senescence and to correlate the hormonal patterns with the protease activities.

D.III.2. Materials and Methods

D.III.2.a Chemicals

Ac-YVAD-cmk, diisopropylfluorophosphate (DFP), E-64 and epoxomicin were provided by SIGMA-ALDRICH®. The probes MV201, DCG04, JOPD1, FY01, MVB072, FP-Rh and FP-biotin (Patricelli *et al.*, 2001; Kolodziejek *et al.*, 2011; Richau *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2015) were available in the laboratory.

D.III.2.b Experimental design

Plants of *Brassica napus* L. (genotypes Ténor and Samourai) were cultivated in a greenhouse at the vegetative stage according to previous experiments detailed by Poret *et al.* (2016). Seedlings were cultivated with 25% Hoagland nutrient solution (1.25 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.25 mM KNO_3 , 0.5 mM MgSO_4 , 0.25 mM KH_2PO_4 , 0.2 mM $\text{EDTA} \cdot 2\text{NaFe} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 14 μM H_3BO_3 , 5 μM MnSO_4 , 3 μM ZnSO_4 , 0.7 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.7 μM CuSO_4 , 0.1 μM CoCl_2) for 6 weeks. Throughout their growth the plants were subjected to a 16h photoperiod with a mean temperature of 20°C (day) / 15°C (night) and received 400 $\mu\text{moles photon. s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ of photosynthetically active radiation at the canopy. During this experiment, the N remobilization in source leaves was determined precisely using a pulse-chase ^{15}N labelling method. Thus, during the first 6 weeks of culture, plants received nitrate labelled with ^{15}N at 2 atom% excess in order to obtain homogenous labelling throughout the plants. After 6 weeks of growth, corresponding to the beginning of treatments (Day 0 (D0)), the ^{15}N -nitrate labelling was stopped and plants were separated into two groups and supplied with 25% Hoagland solution containing two different nitrate concentrations: high (HN: 3.75 mM of CaNO_3) or low nitrate levels (LN: 0.375 mM CaNO_3 with compensation for Ca and K elements by adding 1.25 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 0.875 mM KCl). Leaves were numbered in order of their date of emergence (leaf rank n°1 (L1) was the oldest leaf). At D0, a mature leaf becoming senescent during the experiment (leaf rank n°12 (L12)) was chosen on the basis of its leaf area determined with a LI-COR 300 area meter (LI-COR, Lincoln, NE, USA) and chlorophyll content measured with a SPAD meter (Soil Plant Analysis Development; Minolta, SPAD-502 model). This leaf rank (L12) has a mean leaf area value of $57.88 \text{ cm}^2 \pm 1.96\%$ variation and $33.31 \text{ cm}^2 \pm 6.01\%$ variation for Ténor and Samourai respectively; mean SPAD value of $54.16 \pm 4.55\%$ variation and $55.33 \pm 6.65\%$ variation for Ténor and Samourai, respectively. During the harvests after 0, 16 and 23 days of treatment (D0, D16 and D23), the chlorophyll and anthocyanin levels of L12 were measured by SPAD and an optical sensor system (Multiplex®, Orsay, France; D'Hooghe *et al.*, 2013), respectively. The leaf blade (laminae) of L12 was separated from the petiole and the midrib and was directly frozen at -80°C before further biochemical, proteomic and molecular analyses.

D.III.2.c Quantification of N and ¹⁵N contents

The N and ¹⁵N contents were quantified at D0, D16 and D23 on L12 of Ténor and Samouraï plants subjected to HN or LN supply. The determination was performed with an elemental analyser (EA3000, EuroVector, Milan, Italy) linked to a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (IRMS, IsoPrime GV Instruments, Manchester, UK).

D.III.2.d Profiling of protease activities

Soluble proteins were extracted from 200 mg of L12 fresh tissue with 1 mL of water. After centrifugation (5 min, 13 000 *g*, 4 °C), concentrations were quantified by protein-dye staining (Bradford, 1976) in equivalent bovine serum albumin (BSA).

The labelling of active proteases was carried out according to Poret *et al.* (2016). Protein extracts (20 µL; see **Table D.III-S1** for concentrations of soluble proteins) were incubated in a mix containing 0.5 µM of probe (MV201, FY01 or JOPD1), 50 mM of sodium acetate buffer (NaAc, pH 5.5) and 2 mM DTT (Mix final volume: 200 µL). In parallel, 20 µL of protein extract were incubated in a mix of 50 mM Tris-base buffer (pH 7.5) containing 0.5 µM of MVB072 or 0.25 µM of FP-Rh (200 µL final volume). The two different mixtures were incubated for 4 h (MV201, FY01 or JOPD1) or 1 h (MVB072 or FP-Rh) under gentle agitation in the dark. As control, equal volumes of soluble protein extracts of L12 (D0, D16 and D23) treated under HN or LN conditions were combined and 20 µL of each mixture were treated as described above. An equal volume of DMSO was added to the No-Probe-Control (NPC) and competition experiments were carried out by performing a pre-treatment for 30 min with 50 µM of E-64 (competition with MV201 and FY01), ac-YVAD-cmk (competition with JOPD1), epoxomicin (competition with MVB072) or DFP (competition with FP-Rh) before adding probes. Reactions were stopped by adding 1 mL of ice-cold acetone to precipitate the proteins. After centrifugation (15 min, 16 000 *g*, 4 °C), the pellet was dissolved in 2X SDS-PAGE gel-loading buffer (140 mM sodium dodecyl sulfate, 200 mM Tris, 20% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 0.3 mM Bromophenol Blue), heated at 90°C for 10 min and separated on 12% SDS-PAGE gels. The fluorescence of labelled proteins was visualized by scanning the gels using a Typhoon 9400 scanner (GE Healthcare Life Science, excitation wavelength: 532 nm; emission wavelength: 580 nm). Signals were quantified by ImageJ software. To control the protein quantity after electrophoresis, gels were stained with Coomassie Brilliant Blue stain (0.5 g CBB G250, 10% acetic acid, 45% methanol in ultra-pure water (v/v)), destained (10% acetic acid, 40% methanol in ultra-pure water (v/v)) and scanned. Finally, specific protease activity was expressed as fluorescence intensity.mg⁻¹ protein (see **Table D.III-S1** for concentrations of soluble proteins).

D.III.2.e Identification of active proteases

To identify active proteases previously detected on gels as described above, protein extracts were labelled with biotin-tagged probes and a pull-down of biotinylated proteins was

performed with a modified protocol from [Poret et al. \(2016\)](#). Briefly, 900 µg of protein was labelled with 10 µM of DCG04 or FP-biotin in labelling buffer (50 mM sodium acetate buffer (NaAc, pH 5.5), 2 mM DTT for DCG04 or 50 mM Tris-buffer, pH 7.5 for FP-biotin). Samples were incubated under gentle agitation at room temperature for 4h (for DCG04) or 1h (for FP-biotin). An additional aliquot was treated as described above but without probes as the control. As described by [Chandrasekar et al. \(2014\)](#), the reaction was stopped and the biotin-proteins were purified using streptavidin beads. Finally, after separation on 12% SDS-PAGE gels, the eluted proteins were stained using the silver staining procedure described by [Blum et al. \(1987\)](#).

Bands of interest were manually excised and were reduced at 50°C for 1 h with 10 mM dithiothreitol (DTT, GE Healthcare) and alkylated for 1 h in the dark with 55 mM iodoacetamide (IAA, Sigma). The gel fragments were washed several times with water and ammonium carbonate, dehydrated with 0.1% acetonitrile and dried. Trypsin digestion was performed overnight with a dedicated automated system (MultiPROBE II, PerkinElmer). The gel fragments were subsequently incubated twice for 15 min in acetonitrile solution to extract peptides from the gel pieces. Peptide extracts were then dried and dissolved in a buffer containing 3% acetonitrile and 0.1% formic acid for chromatographic elution. Peptides were enriched, separated and analysed using a 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS equipped with an HPLC-chip cube interface (Agilent Technologies, Massy, France). The fragmentation data were interpreted using the Mass Hunter software (version B.03.01, Agilent Technologies). For protein identification, MS/MS peak lists were extracted, converted into mzdata.xml format files and compared with the protein database (NCBI *Viridiplantae*) using the MASCOT Daemon search engine (version 2.1.3; Matrix Science, London, UK). The searches were performed with no fixed modification and with variable modifications for oxidation of methionine, and with a maximum of two missed cleavage sites. MS/MS spectra were searched with a mass tolerance of 20 ppm for precursor ions and 0.6 Da for MS/MS fragments. Only peptides matching an individual ion score > 48 were considered. Proteins with two or more unique peptides matching the protein sequence were considered as a positive identification. The assigned protein of best match is provided alongside the GenBank accession number. Score, queries matched, peptide matches, different peptide matches, experimental mass and theoretical mass are also presented. In addition, other proteins identified in *Brassica napus* with the same peptides by MASCOT are presented. Protein sequences were matched against sequences of *Brassicaceae* proteins using the NCBI BLAST Protein Database (algorithm blastp) and the best BLAST results are presented with the name of the protein, the organism, the gene accession number and the percentage of sequence identity. Finally, PLCPs were classified according to the classification of [Richau et al. \(2012\)](#) while SPs were classified according to the MEROPS database.

D.III.2.f Immunodetection of SAG12

For immunodetection of the cysteine protease SAG12, soluble proteins (10 µg) were first denatured with Laemmli 2X buffer (Laemmli, 1970) containing 5% β-mercaptoethanol (v/v) and separated on a 4-15% gradient in SDS-PAGE precast Stain-free gels (Mini-PROTEAN® TGXTM Stain Free, Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). The gels were scanned under UV light with a Gel Doc™ EZ scanner (Bio-Rad®, Marne-la-Coquette, France) for detection of proteins and the Western blot to the polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane was performed as described by Desclos *et al.* (2008). The immunodetection of SAG12 was made using specific polyclonal antibody from rabbit provided by Agrisera® (1/4000, diluted in Tris buffer saline – Tween 20 (TBST; Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH8, Tween 20 0.15% (v/v)) containing 5% milk (v/v) to avoid non-specific hybridization). The primary antibody was detected by a secondary antibody from goat coupled with peroxidase (1/10000 diluted in TBST without milk, Bio-Rad®) and detected by enhanced chemiluminescence (ECL kit, Bio-Rad®) using a ProXPRESS 2D proteomic Imaging System (PerkinElmer, Courtaboeuf, France).

D.III.2.g Phytohormone measurements

Phytohormones were extracted by grinding 200 mg of frozen L12 tissue with 1 mL of extraction buffer (methanol 80%, formic acid 1% in ultra-pure water). After 5 min in an ultrasonic bath at 4°C, samples were agitated for 30 min at room temperature and centrifuged at 12 000 *g* (10 min at 4°C). The resulting supernatant containing phytohormones was collected and a second extraction was performed from the resulting pellet. Both supernatants were mixed and evaporated using a SpeedVac. Finally, the pellet was resuspended in 100 µL of methanol containing 1% of formic acid buffer and then analysed by UPLC-ESI (+/-) -TQD as described in Pan *et al.* (2010).

Briefly, the extract obtained is analysed by ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) (Acquity of Waters, Guyancourt, France) on a reverse phase column coupled with a double detection in UV-Visible and by mass spectrometry triple quadrupole (Acquity of Waters, Guyancourt, France), which allows a specificity and sensitivity compatible with the quantification of the phytohormones.

D.III.2.h Statistical analysis

The normality of the data was studied by using the Ryan-Joiner test at 95%. Analysis of variance (ANOVA) and the Newman-Keuls test were performed by using Microsoft® Excel 2010/XLStat® 2014 to compare the means. The non-parametric test of Kruskal-Wallis was carried out if the normality law of the data was not respected. Statistical significance was postulated at $P < 0.05$. Three biological repetitions were analysed ($n=3$) for all measurements and all the data are presented as the mean ± standard deviation (SD).

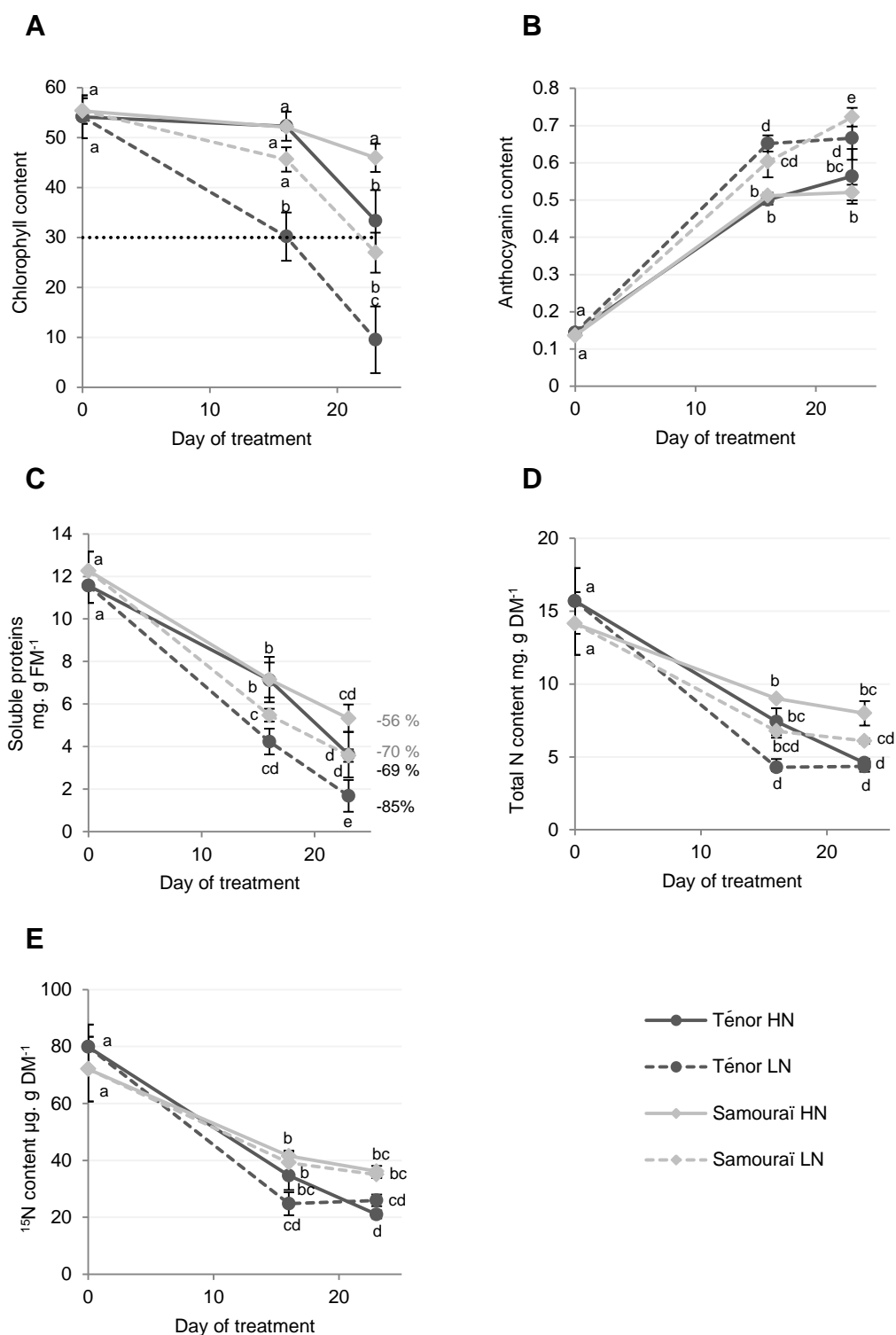


Figure D.III-1: Chlorophyll, anthocyanin, soluble proteins and N and ¹⁵N contents in leaf blades during senescence in two genotypes of *Brassica napus* L. supplied with high (HN) or low (LN) nitrate for 23 days.

Plants (6 weeks old) of two different genotypes (Ténor and Samourai) were subjected to ample (HN: 3.75 mM NO₃⁻) or low nitrate supply (LN: 0.375 mM NO₃⁻) for 23 days. Chlorophyll content of the leaf blade of source leaf (L12) was measured with a SPAD meter (A) and was considered as senescent when the chlorophyll content had decreased by at least 40% of the initial value (here the senescence threshold was placed at 30 SPAD units). Anthocyanin content was measured with an optical sensor system (Multiplex®) (B). The quantity of soluble proteins was determined after extraction by protein-dye staining (Bradford, 1967) (C) and the percentages of degradation between D0 and D23 are indicated. The quantity of total nitrogen (D) and the quantity of ¹⁵N (E) were measured by isotope-ratio mass spectrometry (IRMS). Vertical bars indicate ± SD of the mean (n=3). Statistical differences are represented by letters (P < 0.05, ANOVA, Newman-Keuls test).

D.III.3 Results and Discussion

In order to characterize key proteolytic mechanisms capable of distinguishing genotypes with contrasted NRE, our objective was first to identify and compare senescence-associated protease (SAPs) activities of the two genotypes, Ténor (high NRE) and Samouraï (low NRE) (Girondé *et al.*, 2015a), and second to associate SAP activities with changes in phytohormonal contents.

D.III.3.a Physiological and biochemical changes associated with senescence for Ténor vs Samouraï

The two *Brassica napus* L. genotypes, Ténor and Samouraï, were subjected to ample (HN: 3.75 mM NO₃⁻) or low nitrogen supply (LN: 0.375 mM NO₃⁻) for 23 days after a pulse-chase labelling treatment with ¹⁵N-NO₃⁻. Chlorophylls and anthocyanin contents as well as the soluble proteins and the total N and ¹⁵N contents were followed in a mature leaf (L12, assumed to commence ageing and develop as a source tissue during the time course of the experiment) to study senescence progression during the 23 days of the HN or LN treatments (see the Material and Methods).

As previously shown by Poret *et al.* (2016) in oilseed rape (cv. Aviso), a limitation of nitrate supply accelerated leaf senescence compared to plants subjected to HN conditions in both genotypes (Fig. D.III-1). Indeed, in agreement with the fact that chlorophyll degradation corresponds to one of the first visible processes of ageing (Ougham *et al.*, 2005), chlorophyll content decreased significantly after 23 days under LN conditions compared to the HN supply and particularly for Ténor (9.5 ± 3.8 SPAD units) compared to Samouraï (26.9 ± 2.3 SPAD units) (Fig. D.III-1A). Moreover, the anthocyanin content significantly increased during leaf senescence in the two genotypes and particularly after 23 days under LN supply (Fig. D.III-1B). This increase in anthocyanin content during leaf senescence was previously shown in oilseed rape (Poret *et al.*, 2016) and corresponds to a stress symptom in oilseed rape (D'Hooghe *et al.*, 2013). It was recently proposed that the photo-protective function of anthocyanins prevents the risk of photooxidation and enables a tightly controlled and efficient chlorophyll breakdown during leaf senescence (Diaz *et al.* 2006 ; Koeslin-Findeklee *et al.* 2015).

As proteolysis efficiency is critical for N recycling performance, the quantity of soluble proteins during senescence was compared in Ténor and Samouraï (Fig. D.III-1C). After 23 days, the quantity of soluble proteins was significantly decreased in L12 and this was particularly acute for Ténor under LN conditions with a degradation of 85% of the initial pool of soluble proteins versus only 70% for Samouraï. Then, because the N requirements of growing organs is significantly fulfilled by the transport of N compounds that originate from the recycling of amino acids and soluble proteins in senescing leaves (Demirevska-Kepova *et al.*, 2005; Thoenen *et al.*, 2007), the total N and ¹⁵N contents were studied (Figs. D.III-1D/E). As expected, the amounts of

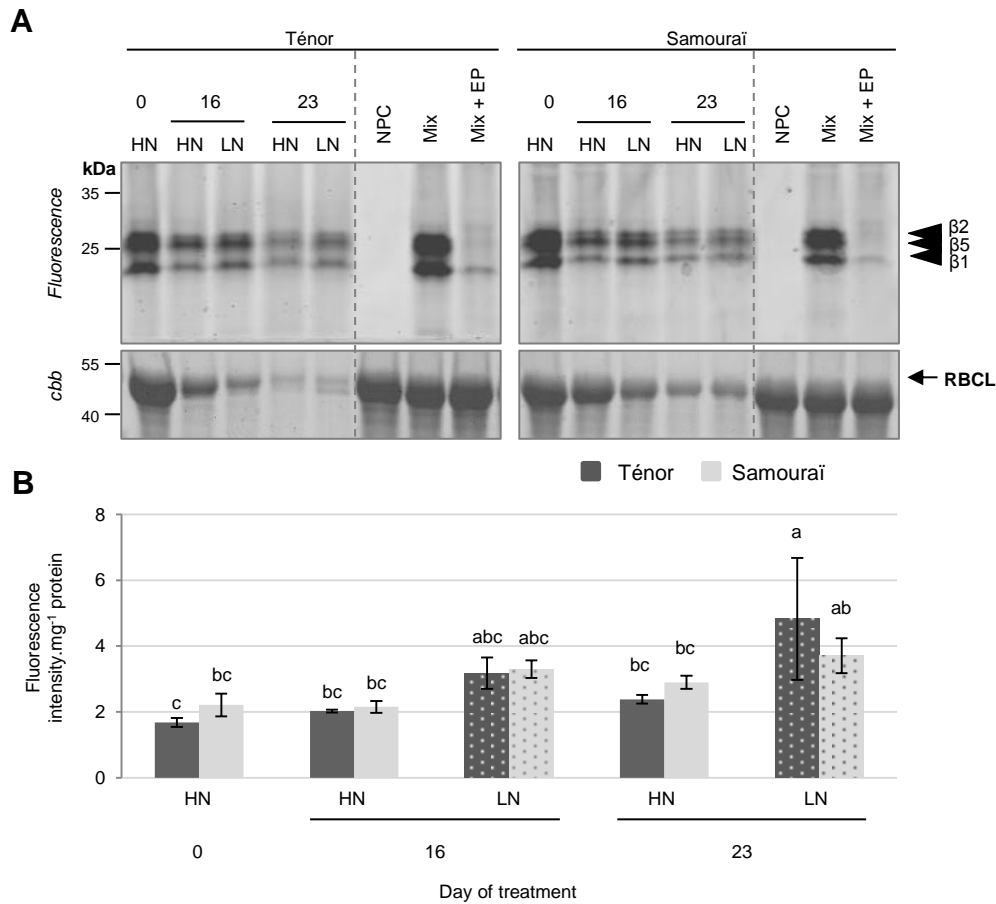


Figure D.III-2: The proteasome activity at pH 7.5 during leaf senescence in two genotypes of *Brassica napus* L. supplied with high (HN) or low (LN) nitrate for 23 days.

Soluble proteins were extracted from leaf blade of source leaf (L12) of Ténor or Samourai plants after 0, 16 and 23 days of HN (3.75 mM NO₃) or LN (0.375 mM NO₃) treatment. Samples were subjected to a labelling of protease activity with MVB072 (specific fluorescent probe of the proteasome) (pH 7.5 ; 1 h labelling). The fluorescence was detected by a scanner after separation of samples by SDS-PAGE (A). Mix corresponds to a mixture of the protein extracts obtained at 0, 16 and 23 days for both treatments (HN and LN) in the presence of MVB072. Mix+EP: mix and epoxomicin (specific inhibitor of the proteasome). NPC : no probe control (absence of MVB072). The protein gel stained by coomassie brilliant blue (cbb) shows the total amount of loaded proteins after incubation. Positions of catalytic subunits of the proteasome (β 1, β 2 and β 5) are represented by black arrowheads. The proteasome activity characterized by the fluorescence intensity was calculated relative to the protein amount (B). The gel is representative of three biological replicates. Vertical bars indicate \pm SD of the mean of three biological replicates. Statistical differences are represented by letters ($P < 0.05$, ANOVA, Newman-Keuls test).

total N and ^{15}N strongly decreased during leaf senescence, which could correspond to an increase in N remobilization from the old source leaves to the young sink organs. Moreover, Ténor was characterized by a stronger decrease in the total N and ^{15}N contents during the 23 days compared to Samourai, with a decrease of 70% in ^{15}N for Ténor versus only 50% for Samourai.

In conclusion, Ténor, which is able to maintain its biomass production under N limitation compared to Samourai (Girondé *et al.*, 2015a), is characterized by a stronger decrease in chlorophyll content, an enhanced degradation of soluble proteins under LN conditions and this leads to a stronger decrease in the ^{15}N and total N quantities under LN conditions compared to Samourai.

D.III.3.b Leaf senescence-associated protease (SAP) activities for Ténor vs Samourai

As shown previously, Ténor is able to strongly degrade soluble proteins compared to Samourai particularly in plants supplied with LN treatment. From these results, two different hypotheses were postulated: (i) the activities of SAPs may be stronger for Ténor than Samourai and/or (ii) Ténor may present other SAPs activities that could be absent in Samourai. In order to validate or refute these hypotheses, the aim was to address the typology of protease activities associated with leaf senescence for Ténor and Samourai. To reach this goal, an appropriate method of labelling active proteases was undertaken at pH 5.5 or 7.5 using activity-based probes specific for different protease classes (van der Hoorn *et Kaiser*, 2012). The following results allowed validation of the two hypotheses postulated above.

Proteasome activity

The proteasome is physiologically active under neutral pH therefore activity was studied at pH 7.5. In order to study proteasome activity during senescence, a labelling assay using MVB072 (a specific probe of the proteasome) was carried out (Fig. D.III-2, Kolodziejek *et al.*, 2011). The sum of the activities of the three related catalytic subunits ($\beta 1$, $\beta 2$ and $\beta 5$) of the proteasome showed that the activity increased only after 23 days of N limitation in Ténor plants (Fig. D.III-2B). These data suggest that the proteasome plays an important role during leaf senescence with an increase in its activity under LN conditions as previously shown in different genotypes of *Brassica napus* L. during leaf senescence (Desclos *et al.*, 2009 (cv. Capitol); Poret *et al.*, 2016 (cv. Aviso)). Indeed, Poret *et al.* (2016) showed that proteasome activity remains stable until the late stages of senescence, whereas Desclos *et al.* (2009) showed an accumulation of the $\beta 1$ subunit in response to nitrate limitation or starvation. Nevertheless, this activity is not significantly stronger in Ténor than Samourai leaves (Fig. D.III-2B). These data suggests that the proteasome seems to not be responsible for the enhanced degradation of soluble proteins during the progression of leaf senescence in Ténor compared to Samourai.

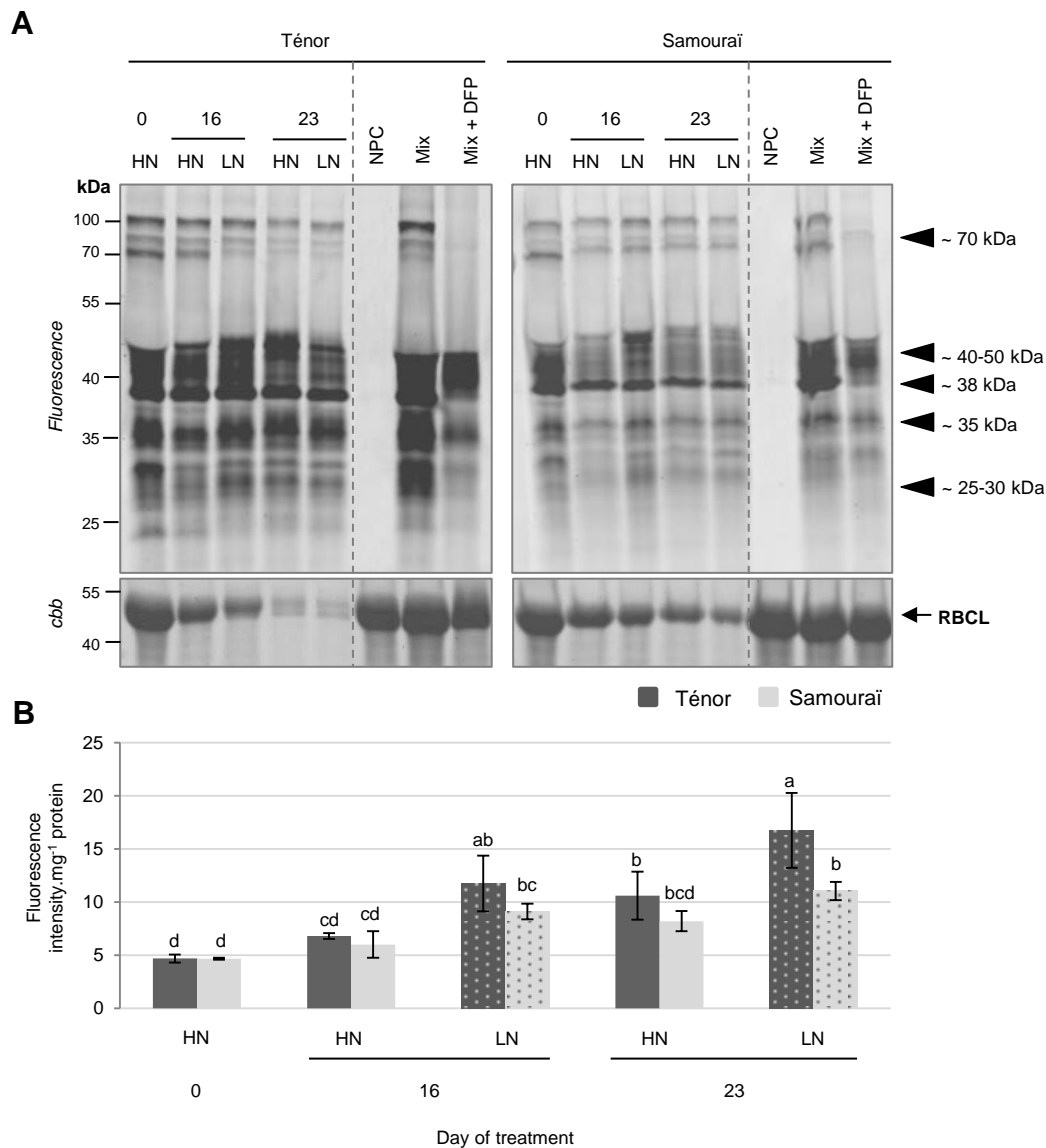


Figure D.III-3: Activity of serine proteases at pH 7.5 during leaf senescence in two genotypes of *Brassica napus* L. supplied with high (HN) or low (LN) nitrate for 23 days.

Soluble proteins were extracted from leaf blade of source leaf (L12) of Ténor or Samourai plants after 0, 16 and 23 days of HN (3.75 mM NO₃⁻) or LN (0.375 mM NO₃⁻) treatment. Samples were subjected to a labelling of protease activity with FP-Rh (specific fluorescent probe of serine proteases) (pH 7.5; 1 h labelling). The fluorescence was detected by a scanner after separation of samples by SDS-PAGE (A). Mix corresponds to a mixture of the protein extracts obtained at 0, 16 and 23 days for both treatments (HN and LN) in the presence of FP-Rh. Mix+DFP: mix and diisopropylfluorophosphate (specific inhibitor of serine proteases). NPC : no probe control (absence of FP-Rh). The protein gel stained by coomassie brilliant blue (cbb) shows the total amount of loaded proteins after incubation. Positions of active proteases are represented by black arrowheads. Serine protease global activity characterized by the fluorescence intensity was calculated relative to the protein amount (B). The gel is representative of three biological replicates. Vertical bars indicate ± SD of the mean of three biological replicates. Statistical differences are represented by letters ($P < 0.05$, ANOVA, Newman-Keuls test).

Serine hydrolase (SH) including serine protease (SP) activities

In order to study SP activities during senescence, labelling with FP-Rh (a specific probe of SHs including SPs) was performed (**Fig. D.III-3**, [Patricelli et al., 2001](#)). It was reported that SPs could be located to the vacuole ([Parrott et al., 2007](#)) and the chloroplast ([Antão et al., 2005](#)), suggesting that SPs could be activated at acidic or neutral pH. Nevertheless, [Poret et al. \(2016\)](#) showed that SH activities at pH 7.5 were strongly activated during leaf senescence in oilseed rape plants. This is why we focused on characterization of the SH activities at pH 7.5. Many of the activities of SPs were detected at 70, 40-50, 38, 35 and 25-30 kDa (**Fig. D.III-3A**) in particular. Quantification of the sum of activities indicated that the global activity of SHs increased during senescence, especially for plants subjected to N limitation for 16 days (**Fig. D.III-3B**). Otherwise, the global SH activity was stronger for Ténor than Samourai plants particularly after 23 days under LN conditions and this could be the result of the stronger activities detected at 38, 35 and 25-30 kDa for Ténor compared to Samourai (**Fig. D.III-3B**).

To identify SPs responsible for these activities, labelling of active SHs using a biotin-tagged FP probe ([Patricelli et al., 2001](#)) was performed followed by purification of the biotinylated proteins (**Fig. D.III-S1**). This was carried out only for the extract from the senescent leaves of Ténor that was subjected to nitrate limitation over 23 days. Many serine hydrolases were identified at 70, 50, 45, 37, 35, 30, 27 and 25 kDa (**Table D.III-1**, SHs identifications are detailed in **Table D.III-S2**). Some of these hydrolases were identified at different molecular weight cutting zones but we identified 8 different prolyl oligopeptidase-like proteases (POPLs, S9) at 70 kDa in particular, 2 subtilisins (S8) at 70 kDa, 10 carboxypeptidase-like proteins (SCPLs S10) at 50, 45, 37, 35, 30 and 27 kDa, 5 carboxylesterases (CXEs) at 45, 37, 35, 30 and 27 kDa. In addition, 1 pectinacetyl esterase (PAE) at 45 kDa, 1 Deg protease (S1) at 37 kDa, 3 S-formylglutathione hydrolases at 35 and 30 kDa, 2 thiolesterases at 25 kDa and 6 methylesterases (MESs) at 25 kDa were identified after LC MS/MS analyses. The majority of the serine hydrolases have not yet been functionally characterized in *Arabidopsis thaliana* ([van der Hoorn et al., 2011](#)) but they seem to be implicated in various biological processes. [Poret et al. \(2016\)](#) also identified active POPLs during leaf senescence after 23 days of LN conditions in *Brassica napus* L. (cv. Aviso) at 70 kDa and two of these were also found in leaves of Ténor (BnaA08g30180D [*Brassica napus*] / gi|674878293; BnaC06g11680D [*Brassica napus*] / gi|674926851). Moreover, several studies have already shown the role of subtilisin-like protease (S8) during senescence in different species [[Roberts et al., 2003, 2006, 2011](#) (wheat); [Parrott et al., 2007](#) (barley); [Poret et al., 2016](#) (oilseed rape)]. As reported in wheat by [Roberts et al. \(2003\)](#), this type of serine hydrolase is able to degrade *in vitro* soluble proteins such as RuBisCO. Interestingly, the protease Do-like 1, chloroplastic ([*Brassica napus*] / gi|923651657) was identified at ~37 kDa. This type of protease is known to play a role in the degradation of protein such as the

Table D.III-1: Summary of LC-MS/MS identifications of cysteine and serine proteases labelled with the biotin-tagged probes, DCG04 and FP, respectively in a senescing leaf of *Brassica napus* L. (cv. Ténor) after 23 days of LN treatment. The assigned protein of best match is provided alongside the GenBank accession number and proteases were classified according to Richau *et al.* (2012) for CPs or the MEROPS database for SPs. Putative cellular locations of these proteases are noted.

Protein accession no [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no.	Classification	Putative location
Cysteine proteases (PLCPs)		
BnaA10g05390D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674926680	RD21-like	Vac
BnaA08g04080D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674916168	RD21-like	Vac
PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [<i>Brassica napus</i>] / gi 923896233	RD21-like	Vac
BnaA06g36920D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674910774	RD21-like	Vac
PREDICTED: cysteine proteinase RD19a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923844541	RD19-like	Vac
PREDICTED: cysteine proteinase RD19a [<i>Brassica napus</i>] / gi 923503374	RD19-like	Vac
senescence-specific cysteine protease [<i>Brassica napus</i>] / gi 5823018	SAG12-like	Vac
BnaA06g40240D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674875014	SAG12-like	Vac
PREDICTED: low-temperature-induced cysteine proteinase-like isoform X2 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923828698	XBCP3-like	Vac
BnaA06g05780D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674939790	XBCP3-like	Vac
BnaCnng01440D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674926134	Cathepsin-B	Vac
BnaA09g52180D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674874900	Cathepsin-B	Vac
BnaC09g35690D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674953141	AALP-like	Vac
BnaC01g26060D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674965096	Zingipain	Vac
Serine proteases SPs		
PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923682725	Subtilisins S8	EC / Vac
BnaCnng41800D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674871280	Subtilisins S8	EC / Vac
PREDICTED: acylamino-acid-releasing enzyme-like isoform X1 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923687883	POPLs S9	?
BnaA08g30180D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674878293	POPLs S9	?
BnaCnng64630D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674859887	POPLs S9	?
BnaCnng28400D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674876980	POPLs S9	?
PREDICTED: prolyl endopeptidase-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923689449	POPLs S9	?
BnaC06g11680D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674926851	POPLs S9	?
PREDICTED: acylamino-acid-releasing enzyme-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923650996	POPLs S9	?
PREDICTED: prolyl endopeptidase-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923644108	POPLs S9	?
BnaA06g18620D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674934323	SCPLs S10	Vac
BnaC01g38630D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674875924	SCPLs S10	Vac
PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923844617	SCPLs S10	Vac
BnaA04g07190D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674893092	SCPLs S10	Vac
BnaA01g06330D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674904822	SCPLs S10	Vac
PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923512696	SCPLs S10	Vac
BnaA08g12880D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674909794	SCPLs S10	Vac
PREDICTED: lysosomal Pro-X carboxypeptidase-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923647110	SCPLs S10	Vac
BnaA04g16130D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674902461	SCPLs S10	Vac
BnaA10g23100D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674963729	SCPLs S10	Vac
PREDICTED: protease Do-like 1, chloroplastic [<i>Brassica napus</i>] / gi 923651657	Deg SPs	Chl

* Chl: chloroplast; EC: extracellular; Vac: vacuolar compartments.

chloroplastic thylakoid-bound protein D1 of photosystem II (Kato *et al.*, 2015). Finally, many active SHs were identified in the senescing leaves of Ténor after 23 days of nitrate limitation. Many of these active SPs could be responsible for the stronger global activity of SPs in Ténor than in Samouraï. Therefore, additional experiments are required to characterize the function of these different active SHs and SPs between genotypes to determine their role in the proteolysis associated with leaf senescence in oilseed rape.

Cysteine proteases (CPs): PLCPs and VPEs

Because cysteine proteases (CPs) are located in the vacuole or in senescence-associated vesicles (SAVs) (Otegui *et al.*, 2005; Martinez *et al.*, 2007), the labelling of CP activities was performed under acidic pH (5.5) according to Poret *et al.* (2016). The protease activity profiling was undertaken with the fluorescent probes MV201 (specific to papain-like cysteine proteases, PLCPs), FY01 (specific to aleurain-like proteases and PLCPs) and JOPD1 (a probe specific for vacuolar processing enzymes, VPEs) (Figs. D.III-4-6).

Many activities of PLCPs were detected using MV201 (Fig. D.III-4A) particularly at ~40, ~35, ~30 and ~27 kDa. The sum of the PLCP activities was quantified (Fig. D.III-4B) and the global activity significantly increased during senescence in leaves of plants subjected to the LN supply during the 23 days. Otherwise, the global PLCP activity was stronger for Ténor than Samouraï after 23 days of LN treatment. This strong PLCP activity was related to the increase in protease activities at ~40 kDa and particularly due to the appearance of a new activity at ~27 kDa for Ténor but not for Samouraï (Fig. D.III-4A).

Moreover, several aleurain-like protease (AALP) and PLCP activities were detected using FY01 (Fig. D.III-5A), particularly at ~40, ~35 and ~27 kDa. The quantification of the sum of these activities (Fig. D.III-5B) showed that the global activity of the aleurain-like and PLCP proteases was significantly increased during senescence in leaves of Ténor alone in response to a nitrate limitation of 23 days. The AALP and PLCP protease activities were increased particularly at ~40 and ~35 kDa while a strong new activity was detected at ~27 kDa. Because the aleurain-like proteases are a sub-group of the PLCPs, this strong activity at ~27 kDa seems to contribute to the new activity for PLCPs at this molecular weight (Fig. D.III-4A).

Finally, 2 VPE activities were detected after labelling with JOPD1 (Fig. D.III-6A) at ~40 and ~37 kDa. The sum of these activities was quantified (Fig. D.III-6B) and the global activity of the VPEs increased during senescence particularly in plants subjected to an N limitation, regardless of the genotype. In contrast to the PLCPs and aleurain-like proteases, VPEs do not seem to be responsible for the contrasted proteolytic processes between Ténor and Samouraï observed in Fig. D.III-1C.

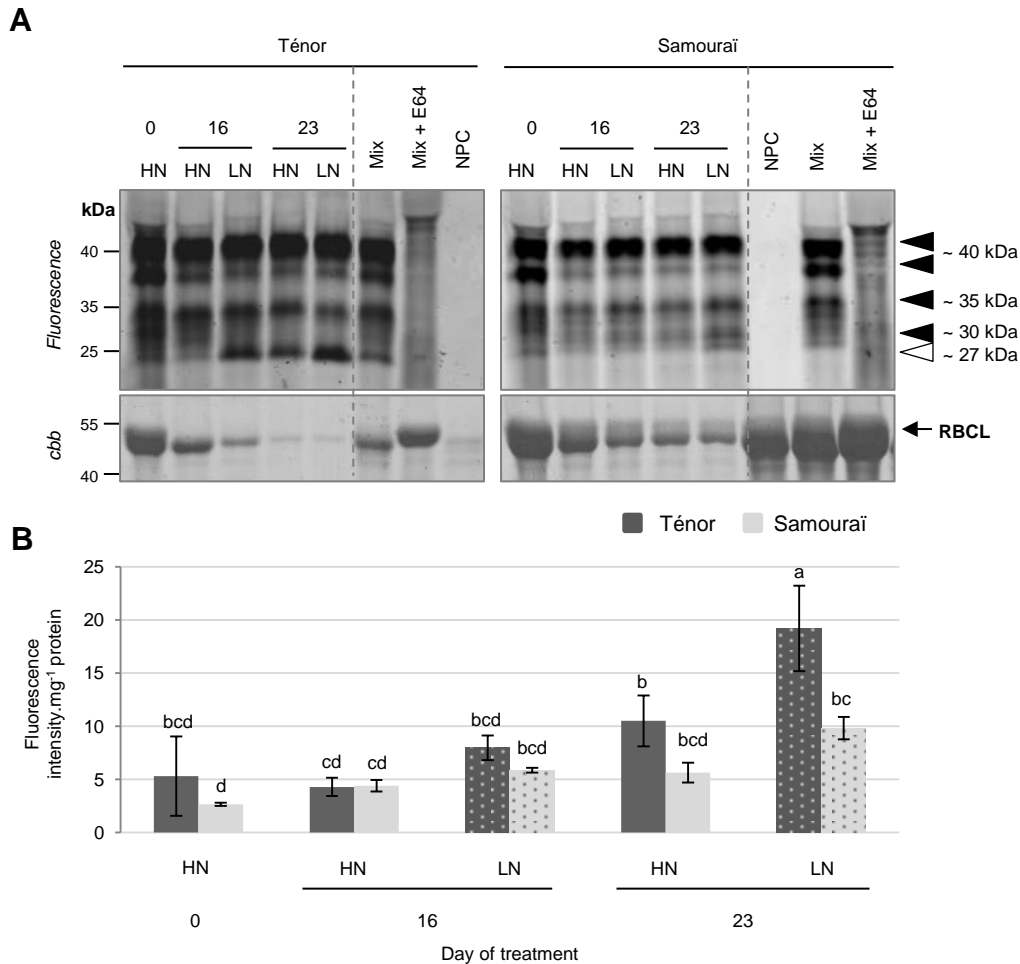


Figure D.III-4: Detection of PLCP activities at pH 5.5 during leaf senescence in two genotypes of *Brassica napus* L. supplied with high (HN) or low (LN) nitrate for 23 days.

Soluble proteins were extracted from leaf blade of source leaf (L12) of Ténor or Samourai plants after 0, 16 and 23 days of HN (3.75 mM NO₃⁻) or LN (0.375 mM NO₃⁻) treatment. Samples were subjected to a labelling of protease activity with MV201 (specific fluorescent probe of PLCPs) (pH 5.5 ; 4 h labelling). The fluorescence was detected by a scanner after separation of samples by SDS-PAGE (A). Mix corresponds to a mixture of the protein extracts obtained at 0, 16 and 23 days for both treatments (HN and LN) in the presence of MV201. Mix+E64: mix and E64 (specific inhibitor of cysteine proteases). NPC : no probe control (absence of MV201). The protein gel stained by coomassie brilliant blue (*ccb*) shows the total amount of loaded proteins after incubation. Positions of active proteases are represented by black arrowheads while white arrowhead shows senescence-induced proteases. PLCP global activity characterized by the fluorescence intensity was calculated relative to the protein amount (B). The gel is representative of three biological replicates. Vertical bars indicate \pm SD of the mean of three biological replicates. Statistical differences are represented by letters ($P < 0.05$, ANOVA, Newman-Keuls test).

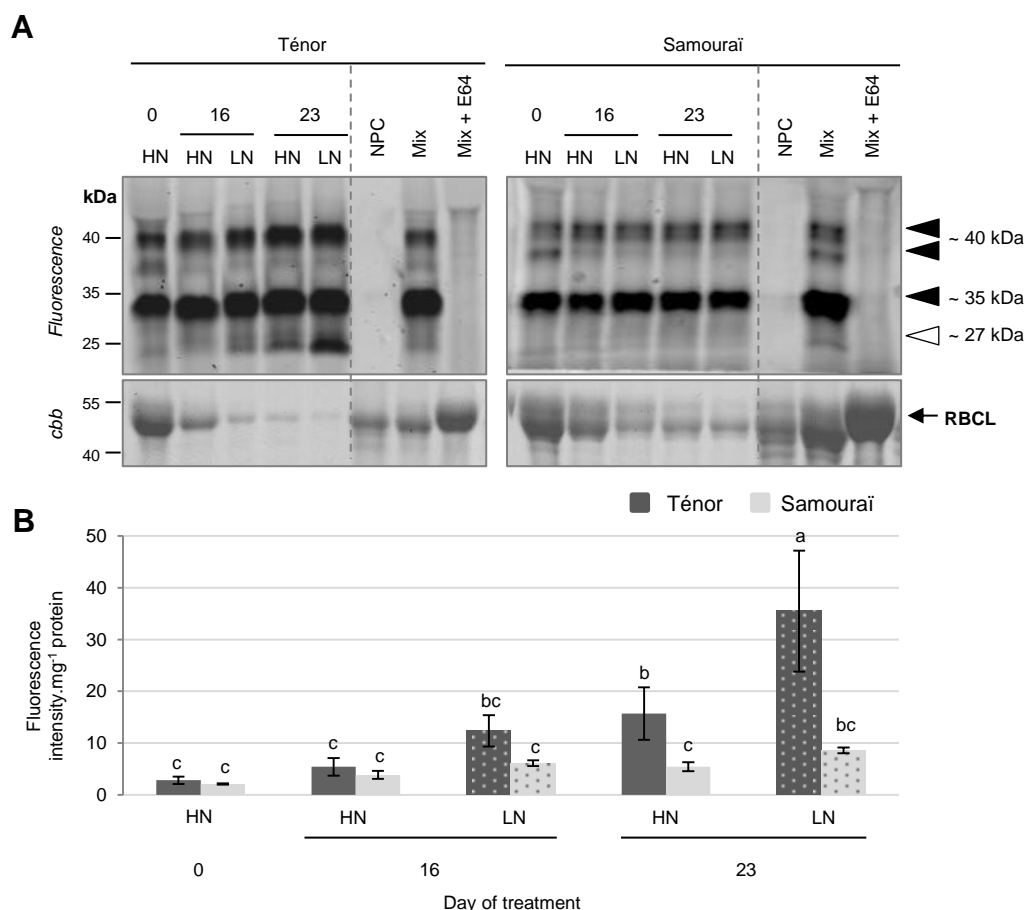


Figure D.III-5: Detection of aleurain-like proteases and other PLCP activities at pH 5.5 during leaf senescence in two genotypes of *Brassica napus* L. supplied with high (HN) or low (LN) nitrate for 23 days.

Soluble proteins were extracted from leaf blade of source leaf (L12) of Ténon or Samourai plants after 0, 16 and 23 days of HN (3.75 mM NO₃⁻) or LN (0.375 mM NO₃⁻) treatment. Samples were subjected to a labelling of protease activity with FY01 (specific fluorescent probe of aleurain-like proteases and other PLCPs) (pH 5.5 ; 4 h labelling). The fluorescence was detected by a scanner after separation of samples by SDS-PAGE (A). Mix corresponds to a mixture of the protein extracts obtained at 0, 16 and 23 days for both treatments (HN and LN) in the presence of FY01. Mix+E64: mix and E64 (specific inhibitor of cysteine proteases). NPC : no probe control (absence of FY01). The protein gel stained by coomassie brilliant blue (cbb) shows the total amount of loaded proteins after incubation. Positions of active proteases are represented by black arrowheads while the white arrowhead shows senescence-induced proteases. Aleurain-like protease global activity characterized by the fluorescence intensity was calculated relative to the protein amount (B). The gel is representative of three biological replicates. Vertical bars indicate ± SD of the mean of three biological replicates. Statistical differences are represented by letters ($P < 0.05$, ANOVA, Newman-Keuls test).

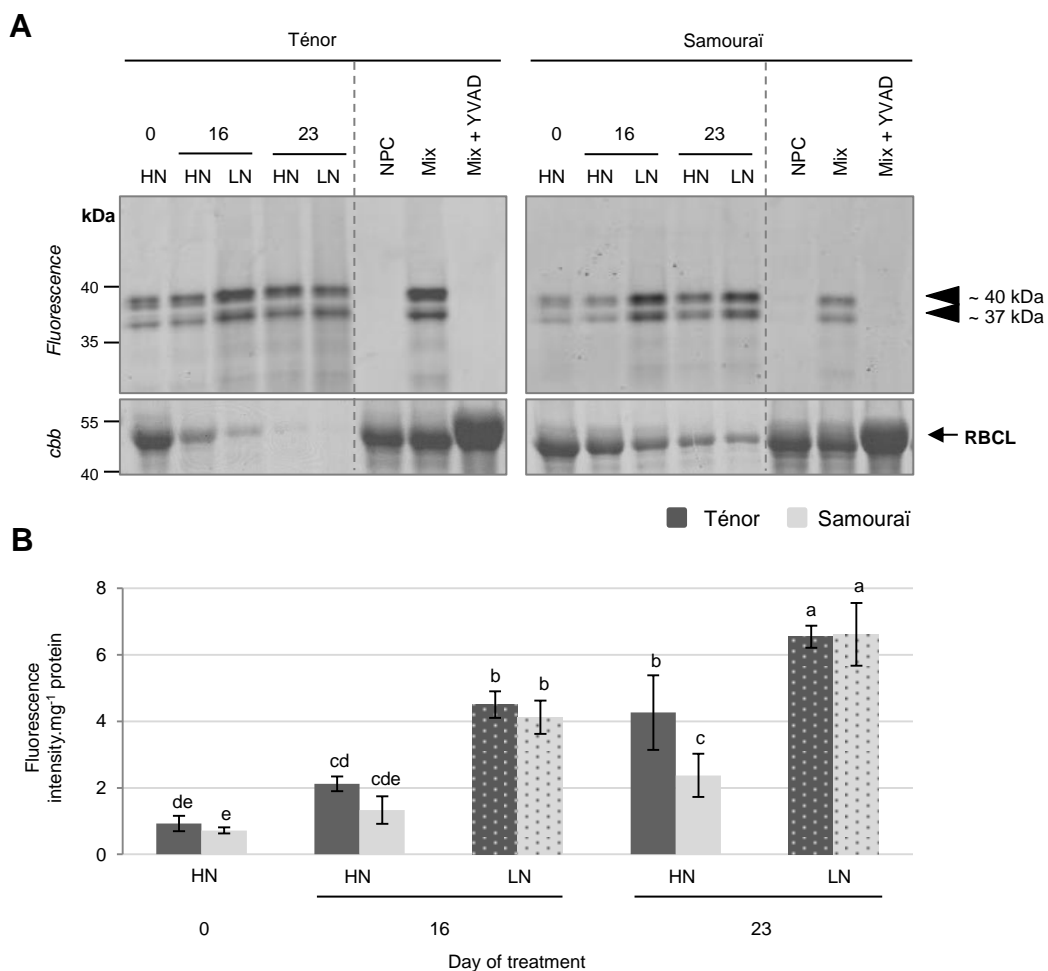


Figure D.III-6: VPE activities at pH 5.5 during leaf senescence in two genotypes of *Brassica napus* L. supplied with high (HN) or low (LN) nitrate for 23 days.

Soluble proteins were extracted from leaf blade of source leaf (L12) of Ténor or Samourai plants after 0, 16 and 23 days of HN (3.75 mM NO₃⁻) or LN (0.375 mM NO₃⁻) treatment. Samples were subjected to a labelling of protease activity with JOPD1 (specific fluorescent probe of VPEs) (pH 5.5 ; 4 h labelling). The fluorescence was detected by a scanner after separation of samples by SDS-PAGE (A). Mix corresponds to a mixture of the protein extracts obtained at 0, 16 and 23 days for both treatments (HN and LN) in the presence of JOPD1. Mix+YVAD: mix and YVAD (specific inhibitor of VPEs). NPC : no probe control (absence of JOPD1). The protein gel stained by coomassie brilliant blue (cbb) shows the total amount of loaded proteins after incubation. Positions of active proteases are represented by black arrowheads. VPE global activity characterized by the fluorescence intensity was calculated relative to the protein amount (B). The gel is representative of three biological replicates. Vertical bars indicate ± SD of the mean of three biological replicates. Statistical differences are represented by letters ($P < 0.05$, ANOVA, Newman-Keuls test).

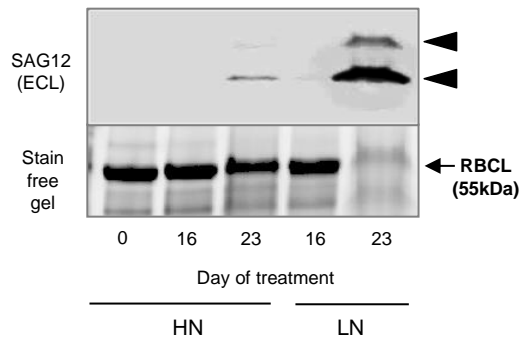
To identify the PLCPs and aleurain-like proteases responsible for the increased total CP activity for Ténor compared to Samouraï, labelling with the biotin-tagged DCG04 probe was performed followed by a pull-down of biotinylated proteins (**Fig. D.III-S1**). As for SPs, this was only performed on the extract from senescent leaves of Ténor subjected to LN supply after 23 days of treatment. Many PLCPs were identified at ~40, ~35, ~30, ~27 and ~25 kDa (**Table D.III-1, Table D.III-S3**). As for the SPs, some of these PLCPs were identified in different molecular weight zones but we identified 5 different RD21-like proteases, 2 RD19-like proteases, 2 SAG12-like proteases, 2 Cathepsin-B, 2 XBCP3-like proteases, 1 aleurain-like protease (AALP) and 1 zingipain.

The CPs are the most up-regulated proteases during leaf senescence ([Bhalerao et al., 2003](#), (*Populus tremula*)) and CP activities can represent 44% of the total protease activity in senescent tissues of *Brassica oleracea* ([Coupe et al., 2003](#)). This class of proteases is involved in proteolytic processes during senescence in wheat ([Thoenen et al., 2007](#)) and is clearly associated with RuBisCO degradation during sequential leaf senescence in the vegetative stages of *Brassica napus* L. ([Poret et al., 2016](#)). Interestingly, many PLCPs are involved in proteolytic processes during senescence in *Arabidopsis thaliana*, such as some of the RD21-like proteases, SAG12-like proteases, AALPs, Cathepsin-B proteases or RD19-like proteases ([Guo et al., 2004](#)). A recent study also showed that activities of some RD21-like, SAG12-like, and XBCP3-like proteases as well as aleurain-like protease (AALP) were especially increased during leaf senescence in *Brassica napus* L. plants submitted to N limitation ([Poret et al., 2016](#) (cv. Aviso)). Moreover, BnaA10g05390D [*Brassica napus*] / gi|674926680 (RD21-like protease) and BnaA06g05780D [*Brassica napus*] / gi|674939790 (XBCP3-like protease) were also identified as proteases involved in the proteolytic process in the genotype Aviso by [Poret et al. \(2016\)](#).

The main goal of this experiment was to identify proteases responsible for the strong activity that appeared at ~27 kDa in Ténor but not in Samouraï for PLCPs and aleurain-like proteases (**Figs. D.III-4A-5A**) and which could be associated with the difference in proteolytic performance between the two genotypes. Many proteases were identified at ~27 kDa and ~25 kDa (**Table D.III-1**) as 3 different RD21-like proteases, 2 cathepsin-B proteases, 2 SAG12-like proteases, 1 RD19-like protease, 2 XBCP3-like proteases and 1 AALP, which could have been responsible for the strong activity at this molecular weight observed with FY01 labelling (**Fig. 5A**). None of these proteases were active during leaf senescence in Samouraï after 23 days of LN treatment compared to Ténor. This is why some of these activities might be associated with the difference in proteolytic performance between the two genotypes.

The *SAG12* gene encodes for a cysteine protease and is considered as a senescence-associated gene marker ([Lohman et al., 1994](#)). [Desclos et al. \(2009\)](#) have shown an up-regulation of *SAG12* expression and *SAG12* protein abundance in senescent leaves of oilseed rape (cv.

A. *Ténor*



B. *Samourai*

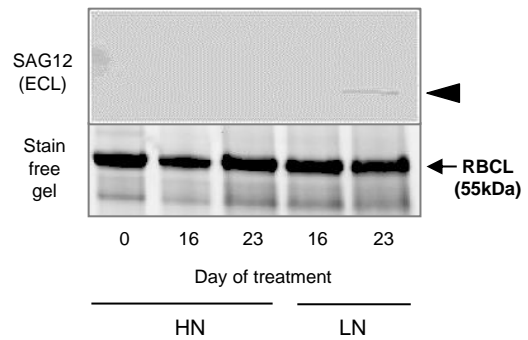


Figure D.III-7: Immunodetection of SAG12 during leaf senescence in two genotypes of *Brassica napus* L. supplied with high (HN) or low (LN) nitrate for 23 days.

Soluble proteins were extracted from leaf blade of source leaf (L12) of *Ténor* or *Samourai* plants after 0, 16 and 23 days of HN (3.75 mM NO_3^-) or LN (0.375 mM NO_3^-) treatment. Ten μg of soluble proteins per lane were separated on a 4-15% gradient in SDS-PAGE precast Stain-free gels (Bio-Rad®) and gels were scanned under UV light to show the total amount of input proteins (see Material and Methods). After the transfer to the polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane, the immunodetection was realized with an antibody specific of SAG12 protein (for details see "Materials and Methods"). The gel is representative of three biological replicates

Capitol) subjected to nitrate limitation. The activity of this type of protease has also been demonstrated in senescing leaves of genotype Aviso subjected to nitrate limitation (Poret *et al.*, 2016). This genotype is able to maintain its leaf biomass production in response to low N supply (Girondé *et al.*, 2015a) in a similar way to Ténor. For this reason immunodetection of SAG12 was carried out in senescent leaves of Ténor or Samouraï plants after 0, 16 and 23 days of HN or LN treatment (Fig. D.III-7). The results clearly showed that the abundance of SAG12 protein was greater in senescing leaves of Ténor plants after 23 days of N limitation compared to Samouraï, and that this result may be associated with the stronger activity of this protease in Ténor than in Samouraï leaves observed after 23 days under LN conditions (Fig. D.III-4).

In conclusion, the strong proteolytic performances of Ténor during the leaf senescence associated with N limitation (Fig. D.III-1C) seem to be closely linked to stronger SP activities (Fig. D.III-3, Table D.III-1), stronger CP activities and different CP activities (Figs. D.III-4-5-7; Table D.III-1) than in Samouraï.

D.III.3.c Phytohormone contents during leaf senescence in Ténor vs Samouraï

The senescence process is highly regulated by different endogenous factors that include the phytohormones (Jibrán *et al.*, 2013; Zhang et Zhou, 213; Khan *et al.*, 2014). Therefore, the difference in leaf-senescence protease activities between Ténor and Samouraï could be associated with differences in the regulation of senescence by phytohormones. To validate or refute this hypothesis, our goal was to study and compare phytohormone contents between Ténor and Samouraï during leaf senescence and correlate the hormonal patterns with the protease activities. To reach this goal, several phytohormone contents were measured by UPLC-ESI (+/-) -TQD in plants of Ténor and Samouraï subjected to HN or LN supply for 23 days (Fig. D.III-8).

Surprisingly, the methyl jasmonate (MeJA) content decreased during leaf senescence regardless of the treatment and the genotype (Fig. D.III-8A) whereas it has been demonstrated that exogenous application of MeJA up-regulates the transcript abundance of genes that are markers of developmental senescence in *Arabidopsis thaliana* (Jung *et al.*, 2007). Similarly, the jasmonic acid (JA) content decreased during leaf senescence in *Brassica napus* L. regardless of the nitrate supply or the genotype (Fig. D.III-8B) while JA biosynthesis is upregulated in senescing leaves of *Arabidopsis thaliana* (Seltmann *et al.*, 2010). Otherwise, the auxin (IAA) content remained stable during leaf senescence irrespective of the nitrate treatment and the genotype (Fig. D.III-8C). The role of auxin (IAA) in senescence is not clear. Indeed, it has been demonstrated that the IAA-induced gene, *SAUR36*, was up-regulated during senescence while its dysfunction induced a delay to senescence in *Arabidopsis thaliana* (Hou *et al.*, 2013). Contrastingly, a senescence repressor role for IAA was demonstrated in *Arabidopsis thaliana*

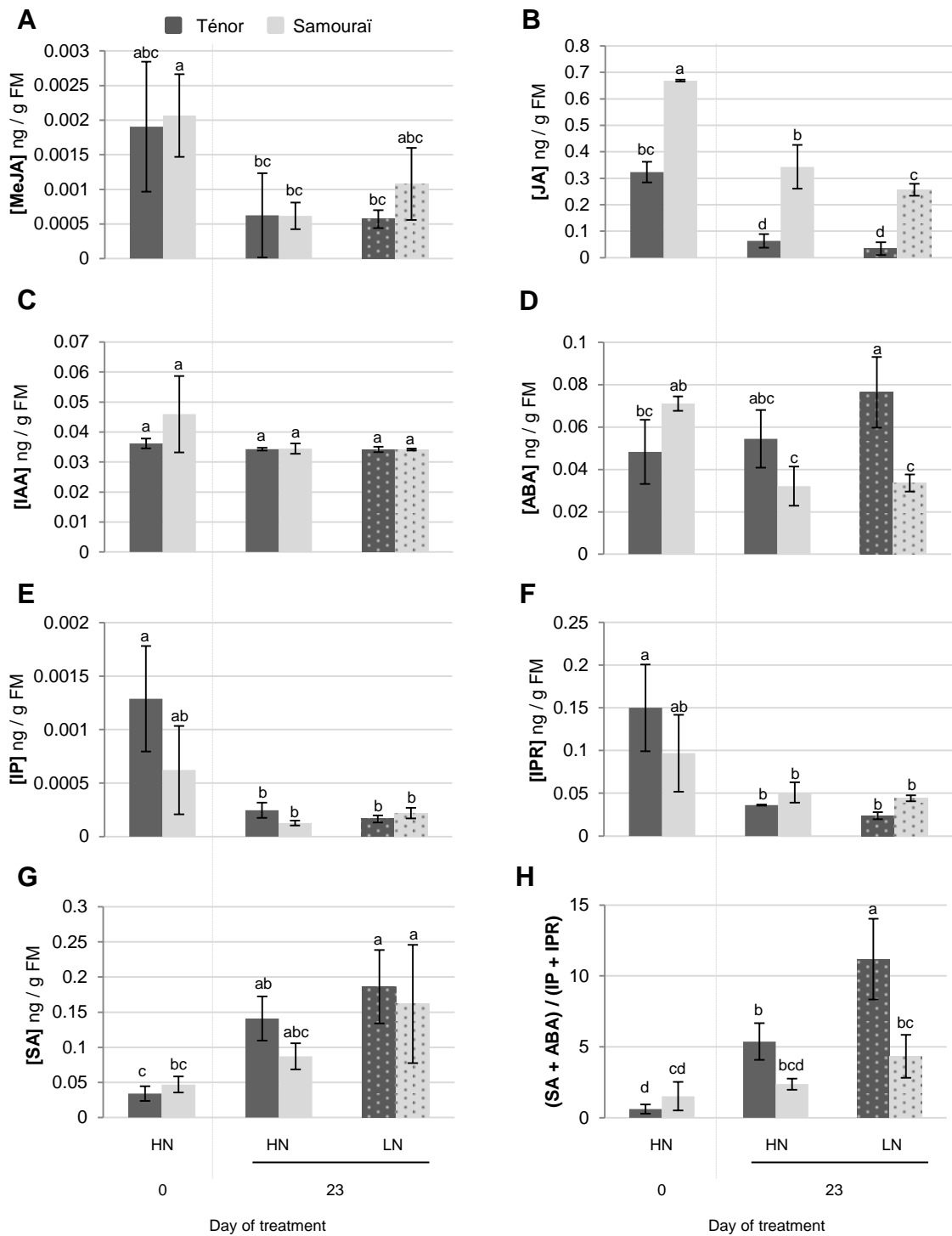


Figure D.III-8: Changes to phytohormone contents during leaf senescence in two genotypes of *Brassica napus* L. supplied with high (HN) or low (LN) nitrate for 23 days.

Phytohormones (**A**: MeJA, methyljasmonate; **B**: JA, jasmonic acid; **C**: IAA, indole acetic acid; **D**: ABA, abscisic acid; **E**: IP, isopentenyladenine; **F**: IPR, isopentenyladenosine and **G**: SA, salicylic acid) were extracted in a methanol / formic acid buffer after 0 and 23 days of HN (3.75 mM NO₃⁻) or LN (0.375 mM NO₃⁻) for two genotypes of *Brassica napus* L. (Ténor and Samourai) and measured by UPLC-MS (for details see Materials and Methods). The ratio of phytohormone contents (SA+ABA)/(IP+IPR) was calculated at D0 and D23 (**H**). Vertical bars indicate ± SD of the mean of three biological replicates. Statistical differences were presented by letters ($P < 0.05$, ANOVA, Newman-Keuls test).

with the down-regulation of several senescence-associated genes (SAGs), including *SAG12*, by an exogenous application of IAA (Noh et Amasino, 1999; Kim et al., 2011). MeJA, JA and IAA do not seem to be associated with the different behaviours observed during leaf senescence in Ténor and Samouraï because the levels were quite similar, and therefore their roles in senescence processes remain unclear in *Brassica napus* L.

Compared to the initial level (Day 0), the ABA content significantly increased during leaf senescence in Tenor after 23 days under nitrate limitation, while it decreased in Samouraï (**Fig. D.III-8D**). A promotive role of ABA has already been demonstrated during senescence in *Arabidopsis thaliana* with the up-regulation of *SAG113* (a senescence associated gene) linked with an increase in the ABA endogenous content (Zhang et Gan, 2012). Moreover, endogenous ABA content increases during senescence in many plant species such as *Avena sativa* (Lim et al., 2007) and *Arabidopsis thaliana* (Zhang et al., 2012).

The SA content increased during leaf senescence in plants subjected to N limitation for 23 days, regardless of the genotype (**Fig. D.III-8G**). This is correlated with the 4-fold increase in SA levels reported in senescent leaves of *Arabidopsis thaliana* by Morris et al. (2000). Moreover, these authors have also reported that a dysfunction of SA synthesis in *Arabidopsis thaliana* leads to a delay in senescence and a down-regulation of *SAG12* expression (Morris et al., 2000).

The contents of two intermediate molecules of cytokinin synthesis, isopentenyladenine (IP) and isopentenyladenosine (IPR), decreased during senescence in plants regardless of the N treatment and the genotype (**Fig. D.III-8E-8F**). This is correlated with the general decrease in cytokinin content observed during leaf senescence in *Nicotiana tabacum* while an increase in the endogenous cytokinin level leads to a delay in senescence processes (Gan et Amasino, 1995). Our results are also in agreement with the fact that over-expression of the isopentenyltransferase gene, responsible for cytokinin biosynthesis, generally leads to senescence delay and stay-green phenotypes in numerous species including *Brassica napus* (Kant et al. 2015, Zeng et Zhao 2016).

Because ABA, SA and cytokinins seem to be strongly involved in the regulation of leaf senescence in *Brassica napus* L., we focused our analysis on the content of these phytohormones. The change in the ratio between phytohormones that accelerate leaf senescence, such as ABA and SA, and those that negatively regulate senescence, such as cytokinins was analysed (**Fig. D.III-8H**). The ratio (SA + ABA) / (IP + IPR) increased greatly during leaf senescence in Ténor plants after 23 days of treatment, and particularly after N limitation, whereas it remained stable for Samouraï leaves regardless of the nitrate treatment. This ratio allowed the two genotypes to be distinguished during senescence as well as a clear separation between the N treatments in Ténor during senescence. This ratio was also clearly correlated with the activities of the PLCPs, the aleurain-like protease and the SPs during senescence with Pearson correlation coefficients of

0.866, 0.932 and 0.905 respectively (p-value <0.0001, data not shown). These data suggested that different hormonal balances during senescence between Ténor and Samouraï could be associated with stronger PLCP and SP activities and proteolytic performance in Ténor compared to Samouraï during senescence, particularly under N limitation. As already described, phytohormones like ABA and SA are able to up-regulate protease transcripts or protease abundance and dysfunction in SA synthesis during senescence leads to down-regulation of *SAG12* gene expression in *Arabidopsis thaliana* (Morris *et al.*, 2000). Further, ABA has been shown to enhance RuBisCO degradation in detached leaves of *Oryza sativa* L. floated on a solution containing ABA compared to those on a solution without ABA (Fukayama *et al.*, 2010). This was correlated with an increase in SDS-dependent protease activities (with an optimum pH 5.5 suggesting a vacuolar localization) that significantly increased with ABA treatment. These types of protease activities are also increased during leaf senescence in rice (Fukayama *et al.*, 2010).

In addition to these data, a preliminary study that infiltrated exogenous SA or water in mature leaves of oilseed rape (cv. Aviso) was performed (Fig. D.III-S2). The degradation of RuBisCO was followed *in vitro* in the presence or absence of MG132 (an inhibitor of CPs and the proteasome) in these leaves. When leaf tissues were infiltrated with SA, the level of RuBisCO degradation was strongly reduced in the presence of MG132 (with a rate of degradation of 32% versus 60% in the absence of MG132) compared to water infiltration (rate of degradation of 46% versus 59% in the absence of MG132) (Fig. D.III-S2). This enhanced inhibition of RuBisCO degradation by MG132 after SA infiltration (inhibition of 46% versus 22% for water infiltration, Fig. D.III-S2) suggests that the contribution of CPs and the proteasome activities to proteolysis is more important after SA application and reinforces the assumption that SA is involved in the regulation of CP and proteasome activities in leaves of oilseed rape. Nevertheless, additional experiments will be required to validate the postulate that these phytohormone patterns could regulate PLCP or SP protease activities.

D.III.4 Concluding remarks

The genotype Ténor, which unlike Samouraï is temporarily able to maintain its biomass production in response to nitrate limitation (Girondé *et al.*, 2015a), demonstrates enhanced senescence processes in response to N restriction including a greater decrease in chlorophyll content, efficient degradation of soluble proteins and a greater decrease in the amount of N in senescing leaves. This efficient proteolytic performance is associated with (i) strong increases in SP and PLCP activities and (ii) the appearance of new PLCP activities such as *SAG12*, which is absent in Samouraï leaves during senescence. Moreover, in contrast to Samouraï, Ténor is characterized by a hormonal balance (SA + ABA) / (IP + IPR) that promotes senescence. This

high ratio between phytohormones positively regulating senescence and phytohormones negatively regulating senescence may be correlated with more efficient protein degradation *via* the induction of PLCP/SP activities for Ténor compared to Samourai during senescence, particularly under nitrate limitation. More specific investigations will be necessary to validate the phytohormone regulation of protease activities during senescence.

Supplemental material

Figure D.III-S1: Detection of PLCPs and SPs labelled with DCG04 and FP-biotin in a senescing leaf of *Brassica napus* L. (cv. Ténor) after 23 days of LN treatment.

Figure D.III-S2: *In vitro* degradation of the large subunit of RuBisCO in the absence or presence of MG132 (inhibitor of cysteine proteases and the proteasome) after infiltration of salicylic acid or water into mature leaves of *Brassica napus* L. (cv. Aviso).

Table D.III-S1: Soluble protein concentrations in leaf blades during senescence of two genotypes of *Brassica napus* L. supplied with high (HN) or low (LN) nitrate for 23 days.

Table D.III-S2: Identification by LC-MS/MS of serine proteases labelled with the biotin-tagged probe FP in senescent leaves of *Brassica napus* L. (cv. Ténor) after 23 days of LN treatment. To characterize SPs observed in Figure 3, labelling with FP-biotin carrying a biotin tag was performed followed by a pull-down of biotinylated proteins (Fig. S1, for details see Material and Methods). The detected zones were excised, treated and analysed by LC-MS/MS. LC-MS/MS spectra were searched against the *Viridiplantae* database focused on *Brassica napus* L. using MASCOT 2.5.0 and only scores higher or equal to 48 were considered. The assigned protein of best match is provided alongside the GenBank accession number. Scores, queries matched, peptide matches, different peptide matches, experimental mass and theoretical mass are also presented. Other proteins identified in *Brassica napus* with the same peptides by MASCOT are also presented. Protein sequences were matched against sequences of Brassicacea proteins using the NCBI Blast Protein Database (algorithm blastp) and better results of blasts are presented with the name of the protein, the organism, the gene accession number and the percentage of sequence identity. Finally, SPs were classified according to the MEROPS database.

Table S3: Identification by LC-MS/MS of PLCPs labelled with the biotin-tagged probe DCG04 in a senescing leaf of *Brassica napus* L. (cv. Ténor) after 23 days of LN treatment. To characterize PLCPs observed in Figure 4, labelling with DCG04 carrying a biotin tag was performed followed by a pull-down of biotinylated proteins (Fig. S1, for details see Material and Methods). The detected zones were excised, treated and analysed by LC-MS/MS. LC-MS/MS spectra were searched against the *Viridiplantae* database focused on *Brassica napus* L. using MASCOT 2.5.0 and only scores higher or equal to 48 were considered. The assigned protein of best match is provided alongside the GenBank accession number. Scores, queries matched, peptide matches, different peptide matches, experimental mass and theoretical mass are also presented. Other proteins identified in *Brassica napus* with the same peptides by MASCOT are also presented. Protein sequences were matched against sequences of Brassicacea proteins using the NCBI BLAST Protein Database (algorithm blastp) and better results of BLASTS are presented with the name of the protein, the organism, the gene accession number and the percentage of sequence identity. Finally, PLCPs were classified according to the classification of Richau *et al.* (2012).

Acknowledgements

This work was funded by the French National Research Agency (ANR-11-BTBR-004 RAPSODYN - Investments for the Future: Optimisation of the RAPeSeed Oil content and Yield under low Nitrogen input) and by a Ph.D. grant to Mrs Marine Poret from the French Ministry of Research and the PhD Doctoral School (EDNBISE, Ecole Doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement). Further financial support was provided by the ERA-IB project "PRODuCE", the Max Planck Society, COST CM1004 and the University of Oxford. The authors would like to thank Dr. Nathalie Nési, INRA (UMR 1349 Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, INRA, Agrocampus Ouest, Université de Rennes) who is the leader of this ANR-program, Dr. Jacques Trouverie and Dr. Philippe Etienne for their useful comments on this study, the P2M2 - Metabolic and Metabolomic profiling platform (INRA, UMR 1349 Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, INRA, Agrocampus Ouest, Université de Rennes) for phytohormone analysis, Dr Laurent Coquet for protein identification by ESI LC-MS/MS on the proteomic platform at the University of Rouen Normandie (Pissaro platform, IFR MP 23, Rouen, France) and finally the UMR EVA technical staff for their skilful assistance. We are most grateful to PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) core facility for all element and isotope analysis used in this study. The authors also wish to acknowledge Dr Laurence Cantrill for proofreading and English correction.

Table D.III-S1: Soluble proteins concentrations in leaf blades during senescence of two genotypes of *Brassica napus* L. supplied with high (HN) or low (LN) nitrate for 23 days.

Plants (6 weeks old) of two different genotypes (Ténon and Samourai) were subjected to ample (HN: 3.75 mM NO₃⁻) or low nitrate supply (LN: 0.375 mM NO₃⁻) for 23 days. The concentration of soluble proteins was determined after extraction by protein-dye staining (Bradford, 1967). Data indicate ± SD of the mean (n=3).

Soluble proteins concentrations (µg/µL)			
Day of treatment	Treatment	Ténon	Samourai
D0	HN	4.77 ± 0.41	4.94 ± 0.38
D16	HN	2.91 ± 0.31	2.91 ± 0.38
D16	LN	1.71 ± 0.24	2.22 ± 0.1
D23	HN	1.50 ± 0.43	2.16 ± 0.28
D23	LN	0.68 ± 0.31	1.46 ± 0.1

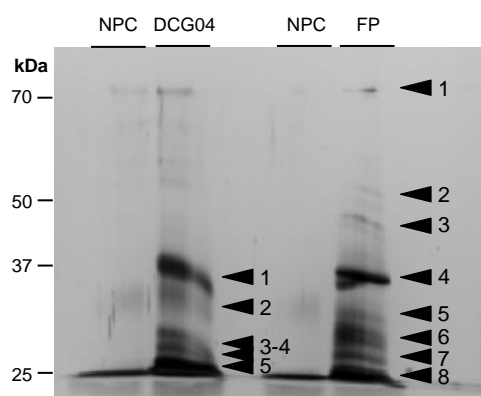


Figure D.III-S1: Detection of PLCPs and SPs labelled with DCG04 and FP-biotin in a senescing leaf of *Brassica napus* L. (cv. Ténon) after 23 days of LN treatment

To characterize PLCPs and SPs observed on the figures D.III-3 and D.III-4, a labelling with the probes DCG04 and FP-biotin carrying a biotin tag was carried out using a pull-down of biotinylated proteins. This was performed only for the extract from the senescent leaf of the genotype Ténon subjected to LN supply after 23 days. The biotin-labelling reaction was stopped and the proteins were purified using streptavidin beads. After SDS-PAGE, proteins were detected by staining with silver nitrate (for details see "Materials and Methods"). NPC corresponds to the no probe controls. Black arrowheads correspond to the excised zones.

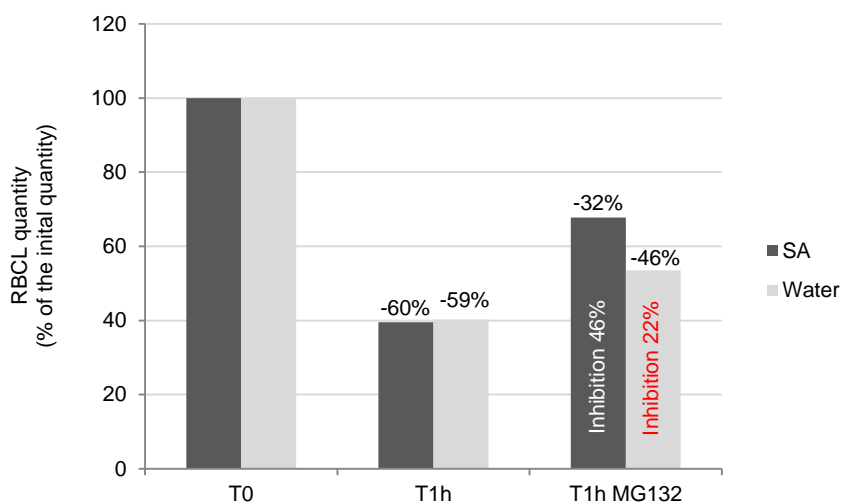


Figure D.III-S2: *In vitro* degradation of the large subunit of RuBisCO in absence or presence of MG132 (inhibitor of cysteine proteases and the proteasome) after infiltration of salicylic acid or water into mature leaves of *Brassica napus* L. (cv. Aviso)

Mature leaves of oilseed rape were infiltrated with water or 1mM of salicylic acid (SA). Soluble proteins were extracted 96h after infiltrations. Samples were incubated in sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.5) for 1h at 37°C without inhibitor or in presence of 0,95 mg/mL of MG132 (inhibitor of cysteine proteases and the proteasome activities). The reaction was stopped by adding ice-cold acetone. To determine the initial quantity of RuBisCo (large subunit, RBCL), another sample was also treated as described above but the reaction was stopped immediately. Samples were separated on SDS-PAGE Stain-free gels (Mini-PROTEAN® TGX™ Stain Free), scanned under UV light with a Gel Doc™ EZ scanner and analysed. The degradation of RBCL was calculated as the difference in quantity between non incubated and incubated samples and expressed as % of RBCL degradation while the % of inhibition due to the MG132 was calculated as the difference in degradation in the presence or absence of the inhibitor.

Table D.III-S2: Identification by LC-MS/MS of serine proteases labelled with the biotin-tagged probe FP in senescent leaves of *Brassica napus* L. (cv. Ténor) after 23 days of LN treatment.

To characterize SPs observed in Figure D.III-3, labelling with FP-biotin carrying a biotin tag was performed followed by a pull-down of biotinylated proteins (Fig. D.III-S1, for details see Material and Methods). The detected zones were excised, treated and analysed by LC-MS/MS. LC-MS/MS spectra were searched against the *Viridiplantae* database focused on *Brassica napus* L. using MASCOT 2.5.0 and only scores higher or equal to 48 were considered. The assigned protein of best match is provided alongside the GenBank accession number. Scores, queries matched, peptide matches, different peptide matches, experimental mass and theoretical mass are also presented. Other proteins identified in *Brassica napus* with the same peptides by MASCOT are also presented. Protein sequences were matched against sequences of Brassicaceae proteins using the NCBI Blast Protein Database (algorithm blastp) and better results of blasts are presented with the name of the protein, the organism, the gene accession number and the percentage of sequence identity. Finally, SPs were classified according to the MEROPS database.

Cutting zone (kDa)	Protein accession no [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no.	Score	Queries Matched	Peptides matched	Different matched peptides	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Theo. pI	Others proteins identified with the same peptides by MASCOT	Result of BLAST Protein [<i>Brassica napus</i>]-Protein [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no. / % identity	Result of BLAST Protein [<i>Brassica napus</i>]-Protein [<i>organism</i>] / NCBI accession no. / % identity	Classification
1 (70)	PREDICTED: acylamino-acid-releasing enzyme-like isoform X1 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923687883	630	35	24	23	89982	90038.97	6.16	PREDICTED: acylamino-acid-releasing enzyme-like isoform X2 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923687886	BnaA08g30180D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674878293 / 97 %	PREDICTED: acylamino-acid-releasing enzyme-like [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922554225 / 96 %	POPLs S9
	BnaA08g30180D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674878293	545	30	21	20	89758	89814.83	6.24	-	PREDICTED: acylamino-acid-releasing enzyme-like isoform X1 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923687883 / 97 %	PREDICTED: acylamino-acid-releasing enzyme-like isoform X1 [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685342486 / 98 %	POPLs S9
	BnaCnng64630D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674859887	406	23	19	18	81782	81844.29	5.35	PREDICTED: prolyl endopeptidase-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923529804	PREDICTED: prolyl endopeptidase-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923529804 / 99 %	PREDICTED: prolyl endopeptidase-like [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685274241 / 99 %	POPLs S9
	BnaCnng28400D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674876980	377	21	19	18	81798	81850.38	5.39	-	PREDICTED: prolyl endopeptidase-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923759471 / 98 %	PREDICTED: prolyl endopeptidase-like [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922424215 / 98 %	POPLs S9
	PREDICTED: prolyl endopeptidase-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923689449	241	20	17	16	90275	90331.87	5.65	-	PREDICTED: prolyl endopeptidase-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923894056 / 99 %	PREDICTED: prolyl endopeptidase [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685338483 / 98 %	POPLs S9
	BnaC06g11680D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674926851	241	12	11	11	90471	90528.61	5.56	PREDICTED: acylamino-acid-releasing enzyme-like isoform X2 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923830688	PREDICTED: acylamino-acid-releasing enzyme-like isoform X2 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923845752 / 99 %	PREDICTED: acylamino-acid-releasing enzyme-like isoform X2 [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922514369 / 99 %	POPLs S9
	BnaA09g50980D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674900475	229	10	10	10	125156	125234.8	5.98	PREDICTED: methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial isoform X1 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923720599	PREDICTED: methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial isoform X1 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923720599 / 99 %	PREDICTED: methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial isoform X1 [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685369767 / 100 %	-
	BnaC08g45780D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674895406	216	10	10	10	124850	124928.4	6.1	PREDICTED: methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial-like isoform X1 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923843993	PREDICTED: methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial-like isoform X1 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923843993 / 100 %	PREDICTED: methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial isoform X1 [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922552838 / 99 %	-
	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923682725	162	9	8	8	73353	73398.89	7.57	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923688592	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923688592 / 100 %	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922567705 / 99 %	Subtilisins S8
	BnaCnng41800D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674871280	139	6	6	6	76219	76267.11	6.5	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923688590	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923688590 / 95 %	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922558104 / 89 %	Subtilisins S8
	PREDICTED: acylamino-acid-releasing enzyme-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923650996	103	6	4	4	82915	82967.26	6.39	-	BnaA01g19230D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674903232 / 98 %	PREDICTED: acylamino-acid-releasing enzyme [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922404900 / 99 %	POPLs S9
	PREDICTED: prolyl endopeptidase-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923644108	83	7	6	6	82713	82765.56	5.16	-	BnaA06g14380D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674903551 / 98 %	PREDICTED: prolyl endopeptidase-like [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922499400 / 99 %	POPLs S9

Table D.III-S2: (Continued)

Cutting zone (kDa)	Protein accession no [Brassica napus] / NCBI accession no.	Score	Queries Matched	Peptides matched	Different matched peptides	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Theo. pI	Others proteins identified with the same peptides by MASCOT	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [Brassica napus] / NCBI accession no. / % identity	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [organism] / NCBI accession no. / % identity	Class.
2 (50)	BnaA06g18620D [Brassica napus] / gjl674934323	338	28	28	17	56843	56878.91	5.35	-	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 47 [Brassica napus] / gjl923525183 / 69 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 48 [Brassica rapa] / gjl685320499 / 99 %	S10
3 (45)	BnaA06g19010D [Brassica napus] / gjl674894935	82	4	4	4	35528	35550.37	5.16	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gjl923844667	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gjl923844667 / 98 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica rapa] / gjl685320048 / 99 %	CXEs
	BnaC04g00530D [Brassica napus] / gjl674891214	74	3	3	3	45594	45623.8	7.79	PREDICTED: pectin acetylesterase 3-like [Brassica napus] / gjl923621469 ; PREDICTED: pectin acetylesterase 3-like [Brassica napus] / gjl923797062	PREDICTED: pectin acetylesterase 3-like [Brassica napus] / gjl923621469 / 98 %	PREDICTED: pectin acetylesterase 3 [Brassica oleracea var. oleracea] / gjl922460707 / 99 %	PAEs
	BnaC01g38630D [Brassica napus] / gjl674875924	69	5	5	3	67210	67253.35	5.31	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 49 [Brassica napus] / gjl923758772	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 49 [Brassica napus] / gjl923758772 / 97 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 49 [Brassica oleracea var. oleracea] / gjl922404380 / 95 %	S10
4 (37)	BnaA06g19010D [Brassica napus] / gjl674894935	668	95	25	16	35528	35550.37	5.16	-	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gjl923844667 / 98 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica rapa] / gjl685320048 / 99 %	CXEs
	PREDICTED: probable carboxylesterase 12, partial [Brassica napus] / gjl923533496	500	52	16	14	29451	29469.5	5.38	-	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gjl923844667 / 98 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica rapa] / gjl685320048 / 99 %	CXEs
	BnaC03g52990D [Brassica napus] / gjl674955644	467	55	16	14	34316	34337.89	5.23	-	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gjl923844667 / 95 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica oleracea var. oleracea] / gjl922431256 / 95 %	CXEs
	PREDICTED: protease Do-like 1, chloroplast [Brassica napus] / gjl923651657	263	12	10	10	46206	46234.66	6	-	-	PREDICTED: protease Do-like 1, chloroplast [Brassica rapa] / gjl685324648 / 99 %	Deg S1
	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica napus] / gjl923844617	82	4	4	4	54114	54148.29	6.83	-	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica napus] / gjl923888443 / 96 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica oleracea var. oleracea] / gjl922568661 / 99 %	S10
BnaA01g20450D [Brassica napus] / gjl674950399	71	12	2	2	35650	35672.84	5.32	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gjl923510819 ; PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gjl923737186	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gjl923510819 / 100 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica rapa] / gjl685262594 / 99 %	CXEs	

Table D.III-S2: (Continued)

Cutting zone (kDa)	Protein accession no [Brassica napus] / NCBI accession no.	Score	Queries Matched	Peptides matched	Different matched peptides	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Theo. pI	Others proteins identified with the same peptides by MASCOT	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [Brassica napus] / NCBI accession no. / % identity	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [organism] / NCBI accession no. / % identity	Class.
5 (35)	BnaA04g07190D [Brassica napus] / gij674893092	184	13	6	5	56619	56655.77	6.21	BnaC04g29380D [Brassica napus] / gij674899250 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 20 [Brassica napus] / gij923826505	BnaC04g29380D [Brassica napus] / gij674899250 / 100 % ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 20 [Brassica napus] / gij923826505 / 91 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 20 [Brassica rapa] / gij685297745 / 97 %	S10
	BnaC04g01950D [Brassica napus] / gij674909212	171	8	4	4	31524	31544.48	5.84	-	PREDICTED: S-formylglutathione hydrolase-like [Brassica napus] / gij923622215 / 98 %	PREDICTED: S-formylglutathione hydrolase-like [Brassica rapa] / gij685304077 / 97 %	-
	BnaA03g19510D [Brassica napus] / gij674897491	165	10	4	4	31869	31888.93	6.24	-	PREDICTED: S-formylglutathione hydrolase [Brassica napus] / gij923544622 / 99 %	PREDICTED: S-formylglutathione hydrolase [Brassica oleracea var. oleracea] / gij922431452 / 99 %	-
	BnaA06g19010D [Brassica napus] / gij674894935	150	9	8	8	35528	35550.37	5.16	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gij923844667	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gij923844667 / 98 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica rapa] / gij685320048 / 99 %	CXEs
	PREDICTED: probable carboxylesterase 12, partial [Brassica napus] / gij923533496	97	8	7	7	29451	29469.5	5.38	-	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gij923844667 / 99 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica rapa] / gij685320048 / 99 %	CXEs
	BnaA01g06330D [Brassica napus] / gij674904822	95	3	2	2	53488	53521.41	5.43	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gij923505359	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gij923505363 / 99 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica rapa] / gij685257732 / 98 %	S10
	BnaA02g33270D [Brassica napus] / gij674902269	87	5	5	5	17414	17424.86	6.5	-	-	PREDICTED: probable carboxylesterase 120 [Brassica rapa] / gij685278524 / 100 %	CXEs
	PREDICTED: S-formylglutathione hydrolase-like [Brassica napus] / gij923622215	74	5	3	3	31438	31458.38	5.57	-	BnaC04g01950D [Brassica napus] / gij674909212 / 98 %	PREDICTED: S-formylglutathione hydrolase-like [Brassica rapa] / gij685304077 / 98 %	-
	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica napus] / gij923844617	68	5	4	4	54114	54148.29	6.83	-	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica napus] / gij923888443 / 96 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica oleracea var. oleracea] / gij922568661 / 99 %	S10

Table D.III-S2: (Continued)

Cutting zone (kDa)	Protein accession no [Brassica napus] / NCBI accession no.	Score	Queries Matched	Peptides matched	Different matched peptides	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Theo. pI	Others proteins identified with the same peptides by MASCOT	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [Brassica napus] / NCBI accession no. / % identity	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [organism] / NCBI accession no. / % identity	Class
6 (30)	BnaA04g07190D [Brassica napus] / gi 674893092	161	17	17	8	56619	56655.77	6.21	-	BnaC04g29380D [Brassica napus] / gi 674899250 / 100 % ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 20 [Brassica napus] / gi 923826505 / 91 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 20 [Brassica rapa] / gi 685297745 / 97 %	S10
	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica napus] / gi 923844617	129	9	9	6	54114	54148.29	6.83	-	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica napus] / gi 923888443 / 96 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922568661 / 99 %	S10
	BnaA06g19010D [Brassica napus] / gi 674894935	123	7	7	5	35528	35550.37	5.16	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gi 923844667	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gi 923844667 / 98 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica rapa] / gi 685320048 / 99 %	CXEs
	BnaA01g06330D [Brassica napus] / gi 674904822	114	11	11	5	53488	53521.41	5.43	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923505359	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923505363 / 99 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica rapa] / gi 685257732 / 98 %	S10
	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923512696	110	4	4	3	53001	53035	6.02	-	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923899898 / 98 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922431566 / 99 %	S10
	BnaA08g12880D [Brassica napus] / gi 674909794	100	4	4	3	53131	53164.05	5.87	-	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923899898 / 99 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica rapa] / gi 685345711 / 98 %	S10
	BnaA03g19510D [Brassica napus] / gi 674897491	81	4	4	4	31869	31888.93	6.24	-	PREDICTED: S-formylglutathione hydrolase [Brassica napus] / gi 923544622 / 99 %	PREDICTED: S-formylglutathione hydrolase [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922431452 / 99 %	-
PREDICTED: probable carboxylesterase 12, partial [Brassica napus] / gi 923533496	77	5	5	4	29451	29469.5	5.38	-	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gi 923844667 / 98 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica rapa] / gi 685320048 / 99 %	CXEs	
PREDICTED: lysosomal Pro-X carboxypeptidase-like [Brassica napus] / gi 923647110	68	2	2	2	57149	57185.35	4.94	PREDICTED: lysosomal Pro-X carboxypeptidase-like [Brassica napus] / gi 923647460	PREDICTED: lysosomal Pro-X carboxypeptidase-like [Brassica napus] / gi 923647460 / 97 %	PREDICTED: lysosomal Pro-X carboxypeptidase [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922431562 / 99 %	S10	
BnaC04g01950D [Brassica napus] / gi 674909212	63	4	4	4	31524	31544.48	5.84	-	PREDICTED: S-formylglutathione hydrolase-like [Brassica napus] / gi 923622215 / 98 %	PREDICTED: S-formylglutathione hydrolase-like [Brassica rapa] / gi 685304077 / 97 %	-	
7 (27)	BnaA04g07190D [Brassica napus] / gi 674893092	162	10	10	6	56619	56655.77	6.21	BnaC04g29380D [Brassica napus] / gi 674899250 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 20 [Brassica napus] / gi 923826505	BnaC04g29380D [Brassica napus] / gi 674899250 / 100 % ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 20 [Brassica napus] / gi 923826505 / 91 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 20 [Brassica rapa] / gi 685297745 / 97 %	S10
	BnaA01g06330D [Brassica napus] / gi 674904822	141	13	13	5	53488	53521.41	5.43	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923505363 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923923220	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923505363 / 99 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica rapa] / gi 685257732 / 98 %	S10
	BnaA04g16130D [Brassica napus] / gi 674902461	133	4	4	4	51093	51125.51	6.74	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 51 [Brassica napus] / gi 923610279 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 51 [Brassica napus] / gi 923616248	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 51 [Brassica napus] / gi 923610302 / 99 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 51 [Brassica rapa] / gi 685300184 / 99 %	S10
	BnaA06g19010D [Brassica napus] / gi 674894935	82	4	4	4	35528	35550.37	5.16	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gi 923844667	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gi 923844667 / 98 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica rapa] / gi 685320048 / 99 %	CXEs
	PREDICTED: probable carboxylesterase 12, partial [Brassica napus] / gi 923533496	67	4	4	4	29451	29469.5	5.38	-	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gi 923844667 / 98 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica rapa] / gi 685320048 / 99 %	CXEs

Table D.III-S2: (Continued)

Cutting zone (kDa)	Protein accession no [Brassica napus] / NCBI accession no.	Score	Queries Matched	Peptides matched	Different matched peptides	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Theo. pI	Others proteins identified with the same peptides by MASCOT	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [Brassica napus] / NCBI accession no. / % identity	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [organism] / NCBI accession no. / % identity	Class.
8 (25)	BnaA01g06330D [Brassica napus] / gi 674904822	350	23	10	8	53488	53521.41	5.43	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923505363 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923923220	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923505363 / 99 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica rapa] / gi 685257732 / 98 %	S10
	BnaA06g19010D [Brassica napus] / gi 674894935	340	20	13	13	35528	35550.37	5.16	-	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gi 923844667 / 98 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica rapa] / gi 685320048 / 99 %	CXEs
	PREDICTED: methylesterase 9-like isoform X1 [Brassica napus] / gi 923605517	238	12	9	9	28933	28952.42	5.11	-	PREDICTED: methylesterase 9-like isoform X2 [Brassica napus] / gi 923618028 / 92 %	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: methylesterase 9-like [Brassica rapa] / gi 685295161 / 98 %	MESs
	PREDICTED: probable carboxylesterase 12, partial [Brassica napus] / gi 923533496	236	14	9	9	29451	29469.5	5.38	-	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gi 923844667 / 98 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica rapa] / gi 685320048 / 99 %	CXEs
	BnaAnng04870D [Brassica napus] / gi 674895008	159	6	6	6	29281	29299.67	7.66	-	BnaC02g43760D [Brassica napus] / gi 674898942 / 96 %	PREDICTED: ovarian cancer-associated gene 2 protein homolog [Brassica rapa] / gi 685279155 / 99 %	-
	BnaA10g23100D [Brassica napus] / gi 674963729	141	9	5	5	53907	53941.01	6.43	-	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica napus] / gi 923888443 / 99 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica rapa] / gi 685379438 / 99 %	S10
	PREDICTED: methylesterase 9-like isoform X1 [Brassica napus] / gi 923618025	139	7	6	6	29068	29087.55	4.89	PREDICTED: methylesterase 9-like isoform X2 [Brassica napus] / gi 923618028	PREDICTED: methylesterase 9-like isoform X2 [Brassica napus] / gi 923618028 / 99 %	PREDICTED: methylesterase 9-like [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922519135 / 91 %	MESs
	BnaC06g11680D [Brassica napus] / gi 674926851	118	4	4	4	90471	90528.61	5.56	PREDICTED: acylamino-acid-releasing enzyme-like isoform X2 [Brassica napus] / gi 923830688	PREDICTED: acylamino-acid-releasing enzyme-like isoform X2 [Brassica napus] / gi 923845752 / 99 %	PREDICTED: acylamino-acid-releasing enzyme-like isoform X2 [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922514369 / 99 %	POPLs S9
	BnaC07g37240D [Brassica napus] / gi 674939288	6	4	4	4	28565	28583.76	5.58	-	BnaA03g45270D [Brassica napus] / gi 674934756 / 94 %	PREDICTED: probable carboxylesterase SOBER1-like isoform X1 [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922516905 / 98 %	CXEs
	BnaC04g36040D [Brassica napus] / gi 674943982	113	6	5	5	27059	27077.27	5.69	-	BnaA04g13790D [Brassica napus] / gi 674893897 / 89 %	PREDICTED: methylesterase 1 [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922469844 / 92 %	MESs
	PREDICTED: acyl-protein thioesterase 2-like [Brassica napus] / gi 923541437	105	5	4	4	26707	26723.43	6.15	PREDICTED: acyl-protein thioesterase 2-like [Brassica napus] / gi 923781182	PREDICTED: acyl-protein thioesterase 2-like [Brassica napus] / gi 923541441 / 99 %	PREDICTED: acyl-protein thioesterase 2 [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922440742 / 99 %	-
	BnaA08g12880D [Brassica napus] / gi 674909794	104	5	4	4	53131	53164.05	5.87	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923512696 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923899898	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923899898 / 99 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica rapa] / gi 685345711 / 98 %	S10
	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica napus] / gi 923844617	103	7	4	4	54114	54148.29	6.83	-	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica napus] / gi 923888443 / 96 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922568661 / 99 %	S10
	BnaA01g00900D [Brassica napus] / gi 674958220	102	4	4	4	28614	28632.94	5.23	PREDICTED: methylesterase 9-like [Brassica napus] / gi 923503739	PREDICTED: methylesterase 9-like [Brassica napus] / gi 923503739 / 99 %	PREDICTED: methylesterase 9-like [Brassica rapa] / gi 685256421 / 99 %	MESs
	PREDICTED: lysosomal Pro-X carboxypeptidase-like [Brassica napus] / gi 923647110	100	5	3	3	57149	57185.35	4.94	-	PREDICTED: lysosomal Pro-X carboxypeptidase-like [Brassica napus] / gi 923647460 / 97 %	PREDICTED: lysosomal Pro-X carboxypeptidase-like [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922431562 / 99 %	S10
	BnaC01g01910D [Brassica napus] / gi 674964800	97	5	5	5	28749	28768.08	5.23	-	BnaA01g00900D [Brassica napus] / gi 674958220 / 96 %	PREDICTED: methylesterase 9-like [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922417442 / 98 %	MESs
	BnaA03g45270D [Brassica napus] / gi 674934756	91	4	3	3	54591	54625.41	5.39	-	BnaC07g37240D [Brassica napus] / gi 674939288 / 94 %	PREDICTED: acyl-protein thioesterase 1 isoform X2 [Brassica rapa] / gi 685292628 / 97 %	-
	BnaC04g32050D [Brassica napus] / gi 674896015	77	3	3	3	28634	28652.11	5.21	-	PREDICTED: methylesterase 4-like [Brassica napus] / gi 923607857 / 94 %	PREDICTED: methylesterase 4-like [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922462038 / 99 %	MESs

Table D.III-S3: Identification by LC-MS/MS of PLCPs labelled with the biotin-tagged probe DCG04 in a senescing leaf of *Brassica napus* L. (cv. Ténor) after 23 days of LN treatment

To characterize PLCPs observed in Figure D.III-4, labelling with DCG04 carrying a biotin tag was performed followed by a pull-down of biotinylated proteins (Fig. D.III-S1, for details see Material and Methods). The detected zones were excised, treated and analysed by LC-MS/MS. LC-MS/MS spectra were searched against the *Viridiplantae* database focused on *Brassica napus* L. using MASCOT 2.5.0 and only scores higher or equal to 48 were considered. The assigned protein of best match is provided alongside the GenBank accession number. Scores, queries matched, peptide matches, different peptide matches, experimental mass and theoretical mass are also presented. Other proteins identified in *Brassica napus* with the same peptides by MASCOT are also presented. Protein sequences were matched against sequences of Brassicaceae proteins using the NCBI BLAST Protein Database (algorithm blastp) and better results of BLASTs are presented with the name of the protein, the organism, the gene accession number and the percentage of sequence identity. Finally, PLCPs were classified according to the classification of Richau *et al.* [43].

Cutting zone (kDa)	Protein accession no [Brassica napus] / NCBI accession no.	Score	Queries matched	Peptides matched	Different matched peptides	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Theo. pI	Others proteins identified with the same peptides by MASCOT	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [Brassica napus] / NCBI accession no. / % identity	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [organism] / NCBI accession no. / % identity	Classification
1 (40)	BnaA10g05390D [Brassica napus] / gi 674926680	425	41	41	13	50452	50484.76	5.3	-	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica napus] / gi 923896233 / 97 %	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922511911 / 98 % ; PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica rapa] / gi 685381850 / 96 %	RD21-like
	BnaA08g04080D [Brassica napus] / gi 674916168	336	31	31	12	51069	50657.95	5.23	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923729007; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923844324	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923729007 / 99 %	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922553936 / 96 %	RD21-like
	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica napus] / gi 923896233	301	37	37	12	50534	50566.84	5.23	-	BnaA10g05390D [Brassica napus] / gi 674926680 / 97 %	senescence-associated cysteine protease [Brassica oleracea] / gi 18141285 / 94 %	RD21-like
	BnaA06g36920D [Brassica napus] / gi 674910774	136	6	6	5	50506	50539.07	5.57	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923652867 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923656414 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like isoform X1 [Brassica napus] / gi 923815285 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like isoform X2 [Brassica napus] / gi 923815292	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923652867 / 99 %	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica rapa] / gi 685326917 / 99 %	RD21-like
	senescence-specific cysteine protease [Brassica napus] / gi 5823018	48	3	13	1	38333	38357.54	6.99	-	PREDICTED: senescence-specific cysteine protease SAG12-like [Brassica napus] / gi 923761352 / 99 %	PREDICTED: senescence-specific cysteine protease SAG12 [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922428544 / 98 %	SAG12-like

Table SD.III-3: (Continued)

Cutting zone (kDa)	Protein accession no [Brassica napus] / NCBI accession no.	Score	Queries Matched	Peptides matched	Different matched peptides	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Theo. pI	Others proteins identified with the same peptides by MASCOT	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [Brassica napus] / NCBI accession no. / % identity	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [organism] / NCBI accession no. / % identity	Classification
2 (35)	BnaA10g05390D [Brassica napus] / gi 674926680	308	11	11	8	50452	50484.76	5.3	-	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923896233 / 97 %	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922511911 / 98 % ; PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica rapa] / gi 685381850 / 96 %	RD21-like
	BnaA06g36920D [Brassica napus] / gi 674910774	269	11	11	7	50506	50539.07	5.57	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923652867 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923656414 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like isoform X1 [Brassica napus] / gi 923815285 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like isoform X2 [Brassica napus] / gi 923815292	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923652867 / 99 %	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica rapa] / gi 685326917 / 99 %	RD21-like
	BnaA08g04080D [Brassica napus] / gi 674916168	209	11	11	6	50625	50657.95	5.23	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923729007; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923844324	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923729007 / 99 %	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922553936 / 96 %	RD21-like
	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica napus] / gi 923896233	186	8	8	6	50534	50566.84	5.23	-	BnaA10g05390D [Brassica napus] / gi 674926680 / 97 %	senescence-associated cysteine protease [Brassica oleracea] / gi 18141285 / 94 %	RD21-like
	senescence-specific cysteine protease [Brassica napus] / gi 5823018	75	4	4	4	38333	38357.54	6.99	-	PREDICTED: senescence-specific cysteine protease SAG12-like [Brassica napus] / gi 923761352 / 99 %	PREDICTED: senescence-specific cysteine protease SAG12 [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922428544 / 98 %	SAG12-like

Table D.III-S3: (Continued)

Cutting zone (kDa)	Protein accession no [Brassica napus] / NCBI accession no.	Score	Queries Matched	Peptides matched	Different matched peptides	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Theo. pI	Others proteins identified with the same peptides by MASCOT	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [Brassica napus] / NCBI accession no. / % identity	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [organism] / NCBI accession no. / % identity	Classification
3 (30)	BnaA10g05390D [Brassica napus] / gi 674926680	239	11	11	7	50452	50484.76	5.3	-	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica napus] / gi 923896233 / 97 %	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922511911 / 98 % ; PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica rapa] / gi 685381850 / 96 %	RD21-like
	BnaA08g04080D [Brassica napus] / gi 674916168	181	11	11	6	51069	50657.95	5.23	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923729007; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923844324	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923729007 / 99 %	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922553936 / 96 %	RD21-like
	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica napus] / gi 923896233	131	7	7	5	50534	50566.84	5.23	-	BnaA10g05390D [Brassica napus] / gi 674926680 / 97 %	senescence-associated cysteine protease [Brassica oleracea] / gi 18141285 / 94 %	RD21-like
	BnaA06g36920D [Brassica napus] / gi 674910774	109	4	4	3	50506	50539.07	5.57	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923652867 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923656414 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like isoform X1 [Brassica napus] / gi 923815285 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like isoform X2 [Brassica napus] / gi 923815292	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923652867 / 99 %	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica rapa] / gi 685326917 / 99 %	RD21-like
	BnaCnng01440D [Brassica napus] / gi 674926134	95	3	3	3	39080	39105.37	5.92	PREDICTED: cathepsin B-like [Brassica napus] / gi 923905506	PREDICTED: cathepsin B-like [Brassica napus] / gi 923905506 / 99 %	PREDICTED: cathepsin B [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922556308 / 99 %	-
	PREDICTED: cysteine proteinase RD19a-like [Brassica napus] / gi 923844541	79	3	3	3	40117	40142.41	7.52	-	PREDICTED: cysteine proteinase RD19a-like [Brassica napus] / gi 923691359 / 95 %	PREDICTED: cysteine proteinase RD19a-like [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922456514 / 99 %	RD19-like
	PREDICTED: cysteine proteinase RD19a [Brassica napus] / gi 923503374	78	3	3	3	39960	39985.15	6.32	PREDICTED: cysteine proteinase RD19a-like [Brassica napus] / gi 923507963 ; BnaA01g05320D [Brassica napus] / gi 674890752	BnaA01g05320D [Brassica napus] / gi 674890752 / 99 % ; PREDICTED: cysteine proteinase RD19a-like [Brassica napus] / >gi 923507963 / 98 %	PREDICTED: cysteine proteinase RD19a [Brassica rapa] / gi 685256046 / 99 %	RD19-like
	BnaA09g52180D [Brassica napus] / gi 674874900	77	3	3	3	38949	38974.14	5.78	-	BnaCnng01440D [Brassica napus] / gi 674926134 / 97 %	cathepsin B [Brassica rapa] / gi 685351924 / 99 %	-
	senescence-specific cysteine protease [Brassica napus] / gi 5823018	65	5	5	4	38333	38357.54	6.99	-	PREDICTED: senescence-specific cysteine protease SAG12-like [Brassica napus] / gi 923761352 / 99 %	senescence-specific cysteine protease SAG12 [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922428544 / 98 %	SAG12-like

Table D.III-S3: (Continued)

Cutting zone (kDa)	Protein accession no [Brassica napus] / NCBI accession no.	Score	Queries Matched	Peptides matched	Different matched peptides	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Theo. pI	Others proteins identified with the same peptides by MASCOT	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [Brassica napus] / NCBI accession no. / % identity	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [organism] / NCBI accession no. / % identity	Classification
4 (27)	BnaA08g04080D [Brassica napus] / gi 674916168	155	5	5	5	50625	50657.95	5.23	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923729007; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923844324	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica napus] / gi 923729007 / 99 %	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922553936 / 96 %	RD21-like
	BnaA10g05390D [Brassica napus] / gi 674926680	126	6	5	5	50452	50484.76	5.3	-	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica napus] / gi 923896233 / 97 %	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922511911 / 98 % ; PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: cysteine proteinase RD21a-like [Brassica rapa] / gi 685381850 / 96 %	RD21-like
	BnaA09g52180D [Brassica napus] / gi 674874900	120	3	3	3	38949	38974.14	5.78	-	BnaCnng01440D [Brassica napus] / gi 674926134 / 97 %	PREDICTED: cathepsin B [Brassica rapa] / gi 685351924 / 99 %	-
	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica napus] / gi 923896233	110	3	5	5	50534	50566.84	5.23	-	BnaA10g05390D [Brassica napus] / gi 674926680 / 97 %	senescence-associated cysteine protease [Brassica oleracea] / gi 18141285 / 94 %	RD21-like
	senescence-specific cysteine protease [Brassica napus] / gi 5823018	100	8	7	5	38333	38357.54	6.99	-	PREDICTED: senescence-specific cysteine protease SAG12-like [Brassica napus] / gi 923761352 / 99 %	PREDICTED: senescence-specific cysteine protease SAG12 [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922428544 / 98 %	SAG12-like
	BnaCnng01440D [Brassica napus] / gi 674926134	98	2	2	2	39080	39105.37	5.92	PREDICTED: cathepsin B-like [Brassica napus] / gi 923905506	PREDICTED: cathepsin B-like [Brassica napus] / gi 923905506 / 99 %	PREDICTED: cathepsin B [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922556308 / 99 %	-
	PREDICTED: cysteine proteinase RD19a-like [Brassica napus] / gi 923844541	51	2	2	2	40117	40142.41	7.52	-	PREDICTED: cysteine proteinase RD19a-like [Brassica napus] / gi 923691359 / 95 %	PREDICTED: cysteine proteinase RD19a-like [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922456514 / 99 %	RD19-like
	BnaA06g40240D [Brassica napus] / gi 674875014	48	4	3	3	35458	35480.31	9.01	PREDICTED: senescence-specific cysteine protease SAG12-like [Brassica napus] / gi 923830350 ; senescence-specific cysteine protease SAG12-like precursor [Brassica napus] / gi 937575369	PREDICTED: senescence-specific cysteine protease SAG12-like [Brassica napus] / gi 923830350 / 93 %	cysteine protease, partial [Brassica rapa var. perviridis] / gi 171702841 / 93 %	SAG12-like

Table D.III-S3: (Continued)

Cutting zone (kDa)	Protein accession no [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no.	Score	Queries Matched	Peptides matched	Different matched peptides	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Theo. pI	Others proteins identified with the same peptides by MASCOT	Result of BLAST Protein [<i>Brassica napus</i>]-Protein [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no. / % identity	Result of BLAST Protein [<i>Brassica napus</i>]-Protein [<i>organism</i>] / NCBI accession no. / % identity	Classification
5 (25)	PREDICTED: low-temperature-induced cysteine proteinase-like isoform X2 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923828698	295	18	11	9	48551	48582.78	6.27	-	BnaA06g05780D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674939790 / 97 %	PREDICTED: low-temperature-induced cysteine proteinase [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922498021 / 99 % ; PREDICTED: low-temperature-induced cysteine proteinase [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685315355 / 98 %	XBCP3-like
	BnaA06g05780D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674939790	260	18	11	10	48789	48821.05	6.59	-	PREDICTED: low-temperature-induced cysteine proteinase-like isoform X2 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923828698 / 97 %	PREDICTED: low-temperature-induced cysteine proteinase [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685315355 / 99 %	XBCP3-like
	BnaC09g35690D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674953141	198	16	9	7	39265	39290.37	5.57	-	thiol protease aleurain precursor [<i>Brassica napus</i>] / gi 937575257 / 97 %	PREDICTED: thiol protease aleurain [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922569050 / 98 % ; senescence-associated cysteine protease [<i>Brassica oleracea</i>] / gi 18141289 / 98 %	AALP-like
	BnaA10g05390D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674926680	160	8	5	5	50452	50484.76	5.3	-	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [<i>Brassica napus</i>] / gi 923896233 / 97 %	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922511911 / 98 % ; PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685381850 / 96 %	RD21-like
	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [<i>Brassica napus</i>] / gi 923896233	159	7	5	5	50534	50566.84	5.23	-	BnaA10g05390D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674926680 / 97 %	senescence-associated cysteine protease [<i>Brassica oleracea</i>] / gi 18141285 / 94 %	RD21-like
	BnaC01g26060D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674965096	135	14	5	5	38107	38131.6	5.21	PREDICTED: zingipain-2-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923628655	PREDICTED: zingipain-2-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923628655 / 98 %	PREDICTED: zingipain-2 [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685262692 / 99 %	-
	BnaA08g04080D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674916168	115	6	4	4	50625	50657.95	5.23	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923729007; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923844324	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923729007 / 99 %	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922553936 / 96 %	RD21-like
	BnaA06g40240D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674875014	75	16	3	3	35458	35480.31	9.01	PREDICTED: senescence-specific cysteine protease SAG12-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923830350; senescence-specific cysteine protease SAG12-like precursor [<i>Brassica napus</i>] / gi 937575369	PREDICTED: senescence-specific cysteine protease SAG12-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923830350 / 93 %	cysteine protease, partial [<i>Brassica rapa</i> var. <i>perviridis</i>] / gi 171702841 / 93 %	SAG12-like

Chapitre D : Résultats

Chapitre D.IV. La sénescence des cotylédons: un modèle pour explorer la variabilité génotypique et la régulation des activités protéasiques associées à l'efficacité de remobilisation de l'azote lors de la sénescence foliaire chez le colza d'hiver

Contexte : Lors des stades végétatifs, le colza présente une faible Efficacité de Remobilisation de l'Azote (ERA) au cours de la sénescence foliaire séquentielle. De plus, une étude comparative entre 2 géotypes de colza d'hiver ayant des ERA contrastées et cultivés sous contrainte azotée (cf. § D.III.), a révélé que la meilleure ERA du géotype Ténor comparée à celle de Samouraï serait associée à une augmentation ratio phytohormonal ([acide salicylique] + [acide abscissique]) / ([cytokinines]) favorisant la sénescence des feuilles ainsi que l'augmentation ou l'induction de l'activité de plusieurs protéases à sérine et cystéine spécifiques.

Objectif : Basé sur l'hypothèse que les différences génotypiques d'activités protéasiques sont observables précocement au cours de la sénescence des cotylédons, le premier objectif de cette étude était de caractériser l'activité des protéases associées à la sénescence cotylédonaire en comparant deux géotypes caractérisés par une ERA contrastée au stade rosette. Le second objectif était de valider au stade cotylédonaire le rôle putatif de l'acide salicylique (SA) et de l'acide abscissique (ABA) sur la régulation de l'activité des protéases associées à la sénescence.

Démarche expérimentale : Les changements biochimiques ainsi que les modifications des activités protéasiques (*via* l'utilisation des techniques ABPP) ont été étudiés chez des cotylédons matures entrant en sénescence. Cette étude a été réalisée chez deux géotypes (Ténor et Samouraï) présentant des ERA contrastées lors de la sénescence foliaire séquentielle. Les jeunes plantes ont été cultivées en serre et soumises ou non à une limitation en nitrate. Par ailleurs, un suivi des activités protéolytiques a été réalisé en réponse à des infiltrations de SA et d'ABA sur des cotylédons matures.

Résultats : Comme lors de la sénescence foliaire séquentielle (stade rosette), la sénescence cotylédonaire s'accompagne d'une diminution des teneurs en chlorophylles et en protéines solubles et d'une augmentation de l'activité des protéases à sérine et à cystéine particulièrement sous contrainte azotée. De plus, deux protéases actives correspondant à des RD21-like, caractéristiques d'une dégradation efficace des protéines chez Ténor par rapport à Samouraï lors de la sénescence foliaire, ont également été identifiées au sein des cotylédons sénescents de Ténor sous contrainte azotée. Ainsi, l'étude de l'activité des protéases à cystéine par les techniques ABPP semble être une piste prometteuse pour cribler des géotypes à ERA contrastée dès le stade cotylédonaire. En utilisant le modèle cotylédon, il a été démontré que l'application exogène d'ABA induit une chute des teneurs en chlorophylles et des protéines solubles ainsi qu'une augmentation de plusieurs activités de protéases à cystéine. Une infiltration de SA a augmenté l'activité de plusieurs protéases à cystéine et sérine-hydrolases sans modifications physiologiques apparentes. Ces résultats démontrent que le cotylédon peut constituer un modèle d'étude expérimental très prometteur pour explorer la variabilité génotypique de l'ERA et caractériser la machinerie protéolytique impliquée dans la remobilisation efficace du N lors de la sénescence.

D.IV. The senescence of cotyledons: a model to explore the genotypic variability of proteolysis machinery and their regulation associated with the nitrogen remobilization efficiency during leaf senescence of *Brassica napus* L.

Marine Poret^{1, 2, 3}, Balakumaran Chandrasekar^{4, 5}, Renier A. L. van der Hoorn⁴, Laurent Coquet^{1, 6}, Thierry Jouenne^{1, 6}, Jean-Christophe Avice^{1, 2, 3*}.

¹ Université de Caen Normandie, F-14032 Caen, France

² UCN, UMR INRA–UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France, F-14032 Caen, France

³ INRA, UMR INRA–UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France

⁴ The Plant Chemetics Laboratory, Department of Plant Sciences, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3RB, United Kingdom

⁵ The Plant Chemetics Laboratory, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Carl-von-Linne Weg 10, 50829 Cologne, Germany

⁶ CNRS UMR6270, "PISSARO" facilities of IRIB-HN, Mont-Saint-Aignan, France

Abstract:

Oilseed rape is characterized by a low nitrogen remobilization efficiency (NRE) during leaf senescence. It was recently showed in this crop that an high phytohormonal balance ([salicylic acid] + [abscisic acid]) / ([cytokinins]) may promote leaf senescence and induces specific serine and cysteine proteases activities leading to a better NRE. Because cotyledons are subjected to senescence, it could be hypothesized that contrasted protease activities between genotypes may be distinguishable precociously during the senescence of cotyledons. To verify this assumption, our goals were (i) to characterize protease activities between two genotypes with contrasting NRE (Ténor and Samouraï) during the senescence of cotyledons under limiting or ample nitrate supply, and (ii) to validate the role of salicylic and abscisic acid on the regulation of proteolysis. As observed in leaves, chlorophyll and soluble protein contents decrease during senescence of cotyledons and is correlated with an increase of serine hydrolases and cysteine protease activities particularly under nitrate limitation. Two RD21-like proteases previously associated with an efficient proteolysis in senescing leaves of Ténor are also detected in senescing cotyledons. An exogenous application of abscisic acid provokes the decrease of chlorophyll and soluble protein contents with an increase of several cysteine protease activities while several activities of cysteine proteases and serine hydrolases increase in response to the salicylic acid infiltration. The study of protease activities during senescence of cotyledons seems to be a promising experimental model system to investigate the genotypic variability for contrasting NRE and the regulation of proteolysis associated with an efficient N remobilization.

Highlights:

- Changes in proteolysis machinery were similar during leaf and cotyledon senescence
- Proteases linked to high NRE during leaf senescence were recovered in cotyledons
- SA and ABA infiltrations regulated protease activities in senescent cotyledons

Keywords: *Brassica napus* L., protease activity, senescence, cotyledon, nitrogen remobilization efficiency, phytohormones, genotypic variability

Abbreviations: AALP, aleurain-like protease; ABA, abscisic acid; AP, aspartic protease; CP, cysteine protease; CXE, carboxylesterase; HN, high nitrate; LN, low nitrate; MES, methylesterase; MP, metalloprotease; N, nitrogen; NPC, no probe control; NRE, nitrogen remobilization efficiency; NUE, nitrogen use efficiency; PAE, pectinacetylerase; PLCP, papain-like cysteine protease; RuBisCO, ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase; SA, salicylic acid; SAP, senescence associated protease; SH, serine hydrolase; SP, serine protease; VPE, vacuolar processing enzyme.

D.IV. 1 Introduction

Oilseed rape (*Brassica napus* L.) corresponds to the second oleaginous crop worldwide behind soybeans with a world production attaining about 64 million tons of grains (Carré and Pouzet, 2014) and the culture of oilseed rape experiencing a resurgence of interest thanks to many food processing and industrial markets. However, despite a strong need for N fertilizers (Ratkhe *et al.*, 2005), oilseed rape is characterized by a weak N use Efficiency (NUE) with only 50% of N from fertilizers is recovered to seeds (Schjoerring *et al.*, 1995). This low NUE is mainly related to a low N remobilization efficiency (NRE) during the ‘sequential’ leaf senescence occurring during the vegetative stages and the transition between vegetative and reproductive phases of development (Malagoli *et al.*, 2005 a, b; Gombert *et al.*, 2006; Avice and Etienne, 2014; Girondé *et al.*, 2015a, 2016). Considering that the improvement of NRE is a major lever to optimize the agri-environmental performances of oilseed rape, it will be necessary to understand the N remobilization associated to senescence processes (Avice and Etienne, 2014; Bouchet *et al.*, 2016).

Senescence corresponds to a genetically controlled process causing many physiological, biochemical and molecular events, resulting in a strong degradation of macromolecules as nucleic acids, lipids and proteins, and leading to the death of all or part of the plant (Krupinska *et al.*, 2012; Avice and Etienne, 2014; Kim *et al.*, 2016). The ‘sequential’ senescence, affecting older leaves along the axis of the plant, leads to nutrient remobilization from source leaves to the sink organs as young leaves (Avice and Etienne, 2014). This process is not only a degenerative

process but an essential process for the survival of the rest of the plant and the survival of the species *via* seed production (Diaz-Mendoza *et al.*, 2016). Moreover, senescence corresponds to a process particularly linked to seed yield and plant productivity (Thomas *et Stoddart*, 1980; Wu *et al.*, 2012; Gregersen *et al.*, 2013).

The senescence process is tightly controlled by environmental and endogenous factors (Guo and Gan, 2005; Kusaba *et al.*, 2013). Among endogenous factors, many hormonal pathways are involved in negative or positive regulation of leaf senescence. These pathways play a role at all stages of senescence whether the initiation, the progression or the final stage of senescence (Lim *et al.*, 2007; Jibrán *et al.*, 2013; Kusaba *et al.*, 2013; Sarwat *et al.*, 2013; Zhang and Zhou, 2013; Khan *et al.*, 2014). Cytokinins (CKs), gibberellins (GAs) and auxin (IAA) correspond to hormones involved in the negative regulation of senescence (Jibrán *et al.*, 2013; Guo and Gan, 2014; Mueller-Roeber and Balazadeh, 2014; Kant *et al.*, 2015; Zeng and Zhao, 2016). On the contrary, abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA), ethylene (ET), methyl jasmonate (MeJA), brassinosteroids (BR) and strigolactones (SL) correspond to hormones able to positively regulate the senescence (Lim *et al.*, 2007; Jibrán *et al.*, 2013; Kusaba *et al.*, 2013; Sarwat *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2014).

During senescence, the protein degradation represents the most important degradation process and the NRE improvement in oilseed rape was tightly associated with the optimization of proteolysis during leaf senescence (Desclos-Théveniau *et al.*, 2014; Girondé *et al.*, 2015a, 2016; Poret *et al.*, 2016). Recent works focused on the understanding of proteolysis processes during senescence of oilseed rape to improve the NRE (Avice and Etienne, 2014; Girondé *et al.*, 2016; Poret *et al.*, 2016). During leaf senescence, the protein breakdown is related to many protease classes: aspartic proteases (APs), metalloproteases (MPs), serine proteases (SPs), cysteine proteases (CPs) and the proteasome (Roberts *et al.*, 2012). Among these classes, CPs and SPs correspond to protease classes the most strongly associated with leaf senescence in various species (Bhalerao *et al.*, 2003; Roberts *et al.*, 2012; Diaz and Martinez, 2013; Diaz-Mendoza *et al.*, 2014; Kidric *et al.*, 2014a). Furthermore, in oilseed rape, recent studies showed that the genotypic variability of leaf NRE under N limitation is related to the proteolysis efficiency and specific protease activities (Girondé *et al.*, 2015a, 2016; Poret *et al.*, 2016; submitted (§ D.III)). For instance, under low N conditions, the genotype Ténor characterized by an high NRE was able to maintain its leaf biomass production thanks to an higher soluble proteins degradation and N remobilization contrary to the genotype Samouraï characterized by a low NRE (Girondé *et al.*, 2015a). This higher leaf proteolysis of Ténor compared to Samouraï was correlated with an increase of SP and CP activities and with the apparition of new CP activities (RD21-like, RD19-like, SAG12-like, cathepsin-B, XBCP3-like and Aleurain-like proteases) (Poret *et al.*, submitted (§ D.III)). Additionally, compared to Samouraï, the genotype

Ténor was characterized by an higher hormonal ratio $([SA] + [ABA]) / ([CK])$ during leaf senescence induced by a N limitation (Poret *et al.*, submitted (§ D.III)). This changes of $([SA] + [ABA]) / ([CK])$ ration is also associated with an higher proteolysis and the increase or the induction of proteases activities (Poret *et al.*, submitted (§ D.III)). Based on these previous results and on the fact that cotyledons are also subjected to a senescence process, it could be assumed that the contrasted protease activities observed at the vegetative stages between genotypes during leaf senescence may be also distinguishable precociously during the senescence of cotyledons. To verify this hypothesis, our aims are (i) to characterize senescence-associated protease activities of Ténor and Samouraï during the senescence of cotyledons, and (ii) to validate the putative role of SA and ABA on the regulation of proteases activity during senescence of cotyledons in oilseed rape. In order to rich these goals, proteases activities were measured by activity-based protein profiling during the senescence of cotyledons under high or low N conditions or after SA and ABA infiltrations.

D.IV.2. Materials and methods

D.IV.2. a Chemicals

Diisopropylfluorophosphate (DFP) and E-64 were provided by SIGMA-ALDRICH®. The probes MV201, DCG04, FP-Rh and FP-biotin (Patricelli *et al.*, 2001; Richau *et al.*, 2012) were available in the laboratory.

D.IV.2.b Experimental design

D.IV.2.b.1 Study of the senescence of the cotyledons under high N or low N conditions

Seeds of two genotypes of *Brassica napus* L. (cv. Ténor and Samurai) were sown and supplied with 25 % Hoagland nutrient solution ((1.25 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.25 mM KNO_3 , 0.5 mM MgSO_4 , 0.25 mM KH_2PO_4 , 0.2 mM $\text{EDTA} \cdot 2\text{NaFe} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 14 μM H_3BO_3 , 5 μM MnSO_4 , 3 μM ZnSO_4 , 0.7 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.7 μM CuSO_4 , 0.1 CoCl_2) until to obtain seedlings with mature cotyledons (15 days). Seedlings were submitted to a photoperiod of 16h (20°C (day) / 15°C (night)) and received 400 $\mu\text{moles photon. s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ of photosynthetic actives radiations. After 15 days, corresponding to the beginning of treatments (Day 0 (D0)), cotyledons were separated in two sets and supplied during 5 days with 25% Hoagland solution containing two different concentrations of nitrate: high (HN: 3.75 mM of CaNO_3) or low nitrate (LN: 0.375 mM CaNO_3 with a compensation of Ca and K elements by adding 1.25 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 0.875 mM KCl). Chlorophyll content was measured at D0, D2 and D5 with a SPAD meter (Soil Plant Analysis Development; Minolta, SPAD-502 model).

The cotyledons were harvested at D0 and after 5 days of treatment (D5). For each date and each treatment, three biological replicates (1 replicate corresponding to 6 cotyledons) were harvested and the samples were immediately frozen in liquid nitrogen before storage at -80 °C before further analyses.

D.IV.2.b.2 Effect of the phytohormone infiltrations on the senescence of cotyledons

Seeds of *Brassica napus* L. (cv. Ténor) were sown and cultivated during 15 days under the same conditions described above (§ 2.2.1.). After 15 days, corresponding to the beginning of experiment (Day 0 (D0)), three treatments were applied. Indeed, cotyledons were infiltrated with 1 mL of water, salicylic acid (SA; 500 µM) or abscisic acid (ABA; 50 µM). The infiltration was performed on the abaxial surface of cotyledon with a needleless syringe by simple pressure. The infiltration was repeated on the same cotyledons, 6 and 12 h after the first injection.

The cotyledons were harvested at D0 and after 3 days of treatment (D3). Before harvests, chlorophyll content was measured at D0 and D3 with a SPAD meter. The number of replicates and the conditions of harvest and sample storage were similar to those described above (§ D.IV.2.b.1).

D.IV.2.c Detection and identification of active proteases

Soluble proteins were extracted from 200 mg of frozen cotyledons with 1 mL of water. After centrifugation (10 min, 13 000 *g*, 4 °C), concentrations were quantified in equivalent serum albumin bovine (BSA) by protein-dye staining (Bradford, 1976).

The detection of active proteases was performed with a labelling of proteases according to Poret *et al.* (2016). Protein extract (20 µg) were incubated in a mix final volume of 200 µL containing 0.5 µM of MV201, 50 mM of sodium acetate buffer (pH 5.5) and 2 mM dithiothreitol. In parallel, 20 µg of protein extract were incubated in a mix final volume of 200 µL containing 0.5 µM of FP-Rh, 150 mM Tris-base buffer (pH 7.5). The two different mixtures were incubated for 4 h (MV201) or 1 h (FP-Rh) in the dark under gentle agitation.

As control, a mixture of equal volumes of soluble protein extracts from cotyledons at D0 and D5 treated under HN or LN conditions or D0 and D3 treated with phytohormones were prepared and 20 µg of each mixture were treated as described above. In the No-Probe-Control (NPC), an equal volume of DMSO was added. Competition experiments were also carried out by performing a pre-treatment during 30 min with 50 µM of E-64 (competition with MV201) or DFP (competition with FP-Rh) before adding probes. The addition of 1 mL of ice-cold acetone permitted to stop the reaction by the precipitation of proteins. After centrifugation (15 min, 16 000 *g*, 4 °C), the pellet was dissolved in 2X SDS-PAGE gel-loading buffer (140 mM sodium dodecyl sulfate, 200 mM Tris, 20% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 0.3 mM Bromophenol Blue), heated at 90°C for 10 min and separated on 12% SDS-PAGE gels. The fluorescent labelled

proteins were detected by a ProXPRESS 2D proteomic Imaging System (PerkinElmer; excitation wavelength: 532 nm; emission wavelength: 580 nm). Signals were quantified by ImageJ software. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue stain (0.5 g CBB G250, 10% acetic acid, 45% methanol in ultra-pure water (v/v)), destained (10% acetic acid, 40% methanol in ultra-pure water (v/v)) and scanned to control the protein quantity after electrophoresis.

To identify active proteases previously detected, protein extracts were labelled with biotin-tagged probes DCG04 (PLCPs labelling) or FP-biotin (SHs labelling) and pull-downs of biotinylated proteins were performed with a modified protocol from [Poret *et al.* \(2016\)](#). In summary, 900 µg of protein were labelled with 10 µM of DCG04 or FP-biotin in labelling buffer (50 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, 2 mM DTT) for DCG04 or 50 mM Tris-buffer (pH 7.5) for FP-biotin. Samples were incubated at room temperature under agitation (4h or 1h for DCG04 or FP-biotin respectively). Another aliquot was treated as described above but without probes as control (NPC, no probe control). Reactions were stopped and the biotin-proteins were purified using streptavidin beads as described by [Chandrasekar *et al.* \(2014\)](#). After separation on 12% SDS-PAGE gels, eluted proteins were detected by a silver nitrate staining ([Blum *et al.*, 1987](#)). Bands of interest were excised manually and the trypsin digestion was performed as described by [Girondé *et al.* \(2016\)](#).

The protease identification was carried out by the proteomic platform IFR MP 23 at the University of Rouen Normandy (Normandy, France). The protein bands of interest were excised from SDS-PAGE gels and were reduced at 50°C for 1 h with 10 mM dithiothreitol and alkylated for 1 h in the dark with 55mM iodoacetamide. The gel fragments were washed several times with water and ammonium carbonate, dehydrated with acetonitrile and dried. Trypsin digestion of gel fragments was performed overnight with a dedicated automated system (MultiPROBE II, PerkinElmer) and followed by twice incubations for 15 min in acetonitrile solution to extract peptides from the gel pieces. Peptide extracts were then dried and dissolved in a buffer containing 3% acetonitrile and 0.1% formic acid for chromatographic elution. Peptides were enriched, separated and analysed using a 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS equipped with an HPLC-chip cube interface (Agilent Technologies, Massy, France). The fragmentation data were interpreted using the Mass Hunter software (version B.03.01, Agilent Technologies). For protein identification, MS/MS peak lists were extracted, converted into mzdata.xml format files and compared with the protein database (NCBIInr-Viridiplantae) using the MASCOT Daemon search engine (version 2.1.3; Matrix Science, London, UK). The searches were performed with no fixed modification and with variable modifications for oxidation of methionine, and with a maximum of two missed cleavage sites. MS/MS spectra were searched with a mass tolerance of 20 ppm for precursor ions and 0.6 Da for MS/MS fragments. Only peptides matching an individual ion score > 41 were considered. Proteins with two or more unique peptides matching the protein

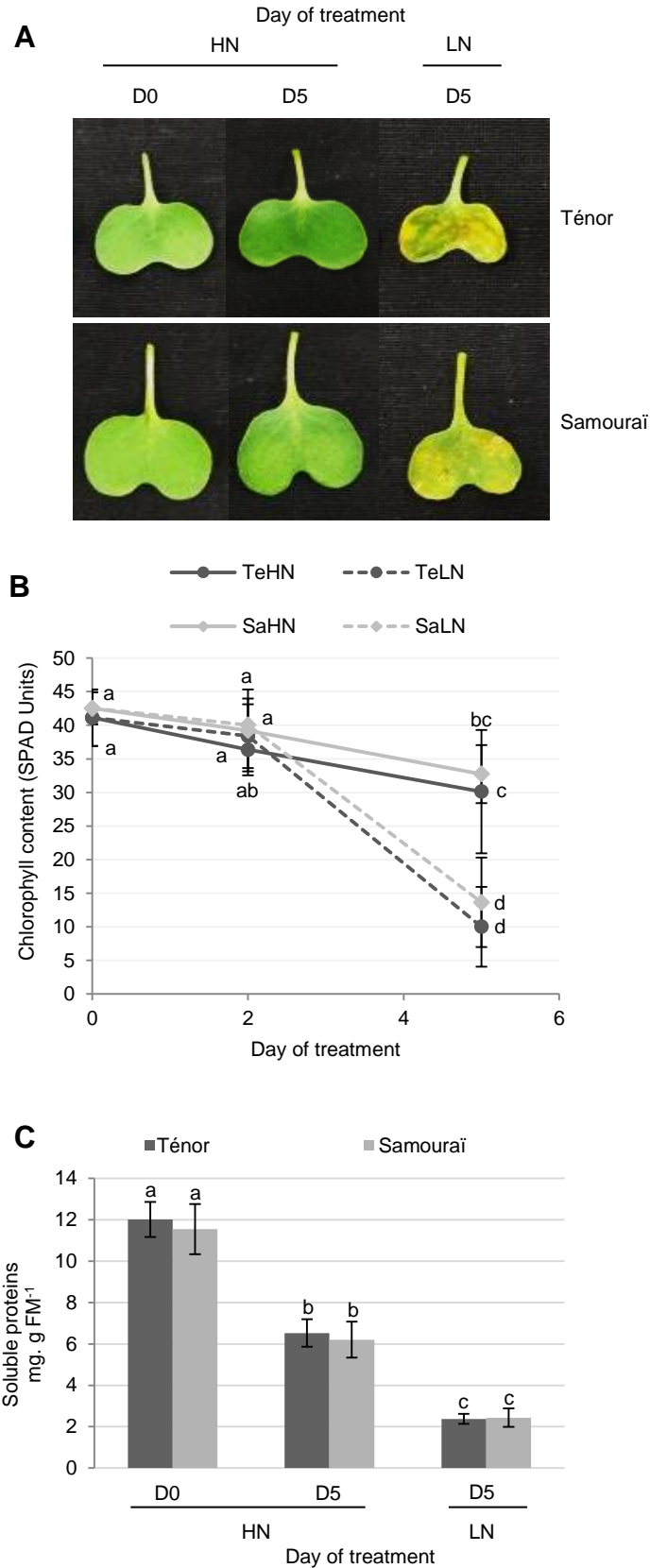


Figure D.IV-1: Chlorophyll (A, B) and soluble protein (C) contents during the senescence of cotyledons of two genotypes of oilseed rape supplied with high (HN) or low (LN) nitrate during 5 days. Cotyledons (20 days old) of two different genotypes (Ténor and Samourai) were subjected to ample (HN: 3.75 mM NO₃⁻) or low nitrogen supply (LN: 0.375 mM NO₃⁻) during 5 days. Vertical bars correspond to ± SD of the mean (n=3). Letters represent the statistics (P < 0.05, ANOVA, Newman-Keuls test).

sequence were considered as a positive identification. The identified protein with the best match is provided with the GenBank accession number while other proteins recognized with the same peptides were also presented. Score, peptide matches, different peptide matches, experimental mass and theoretical mass are presented. The NCBI Blast Protein Database (algorithm blastp) was also used to compare protein sequences against sequences of *Brassicacea* proteins. The best results of blasts were presented with the name of the protein, the organism, the gene accession number and the percentage of sequence identity. PLCPs and SHs were ranked according to the classification of Richau *et al.* (2012) and the MEROPS database, respectively.

D.IV.2.d Statistical analysis

The Ryan-Joiner test at 95% was used to study the normality of the data. By using the software Microsoft® Excel 2010/XLStat® 2016, the means were compared by analysis of variance (ANOVA) and the Newman-Keuls test. If the normality law of the data was not respected, the non-parametric test of Kruskal-Wallis was used. Statistical significance was postulated at $P < 0.05$. Three biological repetitions were analyzed ($n=3$, 1 replicate corresponding to 6 cotyledons) for all measurement and all the data are presented as the mean \pm standard deviation (SD).

D.IV.3 Results and Discussion

D.IV.3.a Characterization of physiological and proteolysis events during the senescence of cotyledons in two genotypes of oilseed rape with contrasted NRE

D.IV.3.a.1 Physiological modifications during the senescence of cotyledons

In order to characterize physiological changes associated to the senescence of cotyledon, 20 days old plants of two genotypes of oilseed rape (cv. Ténor and Samouraï) were subjected to ample (HN: 3.75 mM NO₃⁻) or low nitrogen supply (LN: 0.375 mM NO₃⁻) for 5 days. As expected, results showed that chlorophyll content decreases during the senescence of cotyledons after 5 days regardless of the genotype (**Figures D.IV-1A and D.IV-1B**). In cotyledons subjected to a nitrate limitation, the chlorophyll amount strongly declines (on average -70%) compared to only -25% in cotyledons supplied with an HN solution (**Figure D.IV-1B**). This decrease of chlorophyll was clearly observed on the **Figure D.IV-1A**. During leaf senescence, it was demonstrated that the decrease of chlorophyll content was higher for Ténor than Samouraï (Poret *et al.*, submitted (§ D.III)). Contrary to leaves, the decrease of chlorophyll level during the senescence of cotyledons under a limitation of N was not different between Ténor and Samouraï (**Figure D.IV-1B**).

Soluble protein contents decrease significantly during the senescence of cotyledons after 5 days particularly under LN treatment (-80%) compared to HN treatment (-46%) (**Figure D.IV-**

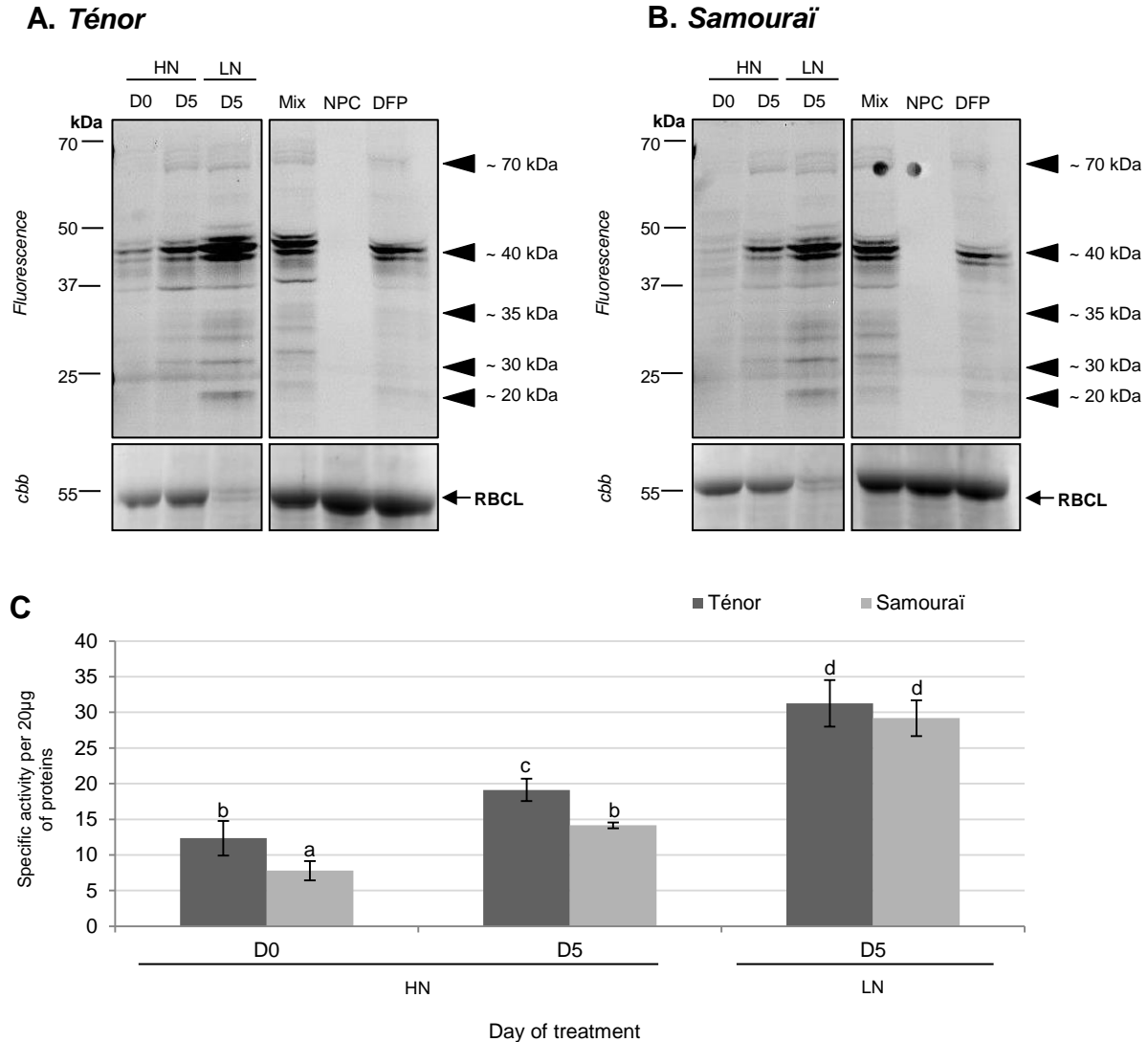


Figure D.IV-2: Serine hydrolases (SHs) activity at pH 7.5 during the senescence of cotyledons of two genotypes of oilseed rape supplied with high (HN) or low (LN) nitrate during 5 days. Soluble proteins of cotyledons were extracted from Ténor or Samourai plants after 0 and 5 days of treatment HN (3.75 mM NO₃⁻) or LN (0.375 mM NO₃⁻). A labelling of protease activity with FP-Rh (specific fluorescent probe of SHs) (pH 7.5; 1h labelling) was performed. After SDS-PAGE, the fluorescence was detected by a scanner (A: Ténor; B: Samourai). As control, Mix corresponds to a mix of 0 and 5 days extracts (HN and LN) in the presence of FP-Rh, NPC corresponds to the same mix in absence of FP-Rh (no probe control) and DFP corresponds to the same mix in presence of FP-Rh and DFP (specific inhibitor of serine proteases). The total amount of input proteins after incubation is represented by the protein gel stained by coomassie brilliant blue (cbb). Positions of active proteases were represented by black arrowheads. SHs global activity characterized by the fluorescence intensity was calculated by the software Image J® (C). The presented gel is representative of three biological replicates. Vertical bars correspond to ± SD of the mean (n=3). Letters represent the statistics (P < 0.05, ANOVA, Newman-Keuls test).

1C). Furthermore, this decrease was not significantly different between Ténor and Samouraï. These observations confirm those previously described in cotyledons (Ghosh *et al.*, 2001) or leaves (Desclos *et al.*, 2009; Girondé *et al.*, 2015a, 2016) in oilseed rape for total proteins during the senescence. Nevertheless, contrary to cotyledons, it was recently reported that the rate of proteolysis during leaf senescence induced by N limitation was stronger for Ténor than Samouraï (Poret *et al.*, submitted (§ D.III)).

Based on these results, it was confirmed that the senescence of cotyledons was accelerated by a N limitation as for leaf senescence in oilseed rape (Ghosh *et al.*, 2001; Desclos *et al.*, 2009). Otherwise, even if Ténor was characterized by an higher NRE during the sequential leaf senescence associated to a N limitation compared to Samouraï (Girondé *et al.*, 2015a, 2016; Poret *et al.*, submitted (§ D.III)), this genotypic difference was not physiologically observed during the senescence of cotyledons under our experimental conditions. However, in our experiment, the senescence of cotyledons was particularly rapid especially for the N limitation treatment. As a consequence, it may be possible that chlorophyll contents and rate of proteolysis associated to the contrasted NRE between genotypes during leaf senescence were already present in Ténor compared to Samouraï during the senescence of cotyledons without physiological consequences.

D.IV.3.a.2 Modifications of protease activities during the senescence of cotyledons

A standard protease activity profiling of SHs (using FP-Rh, a specific fluorescent probe of serine hydrolases) and CPs (using MV201, a specific fluorescent probe of papain-like cysteine proteases, PLCPs) were performed on soluble protein extracts from cotyledons after 0 and 5 days of LN and HN treatments.

Using the labelling of SHs with FP-Rh, it was observed that the total specific activity of SHs was significantly increased between 0 and 5 days particularly under LN condition for both genotypes (2.5 fold for Ténor and 3.7 fold for Samouraï; **Figure D.IV-2B**). Indeed, activities at ~70, ~40, ~35, ~30 and ~25 kDa increased during senescence between D0 and D5 under LN conditions in Ténor and Samouraï cotyledons (**Figure D.IV-2A**). Activities of SHs were higher in Ténor than Samouraï cotyledons after 5 days of HN treatment. Finally, the increase of SHs activities was significantly correlated with the decrease of soluble proteins observed on the **Figure D.IV-1C** ($r = -0.899$; $p\text{-value} < 0.0001$). These results were consistent with previous results showed that a gene encoding a serine carboxypeptidase was up-regulated gradually from the green to yellow cotyledons of cucumber (Kim, 2004). Moreover, during leaf senescence of oilseed rape, the global activity of serine proteases was increased particularly in response to N limitation (Girondé *et al.*, 2016; Poret *et al.*, 2016; submitted (§ D.III)).

To identify labelled SHs (**Figure D.IV-2**), an activity-dependent labelling with FP-biotin followed by a pull-down of biotinylated proteins was performed on cotyledon of Ténor after 5

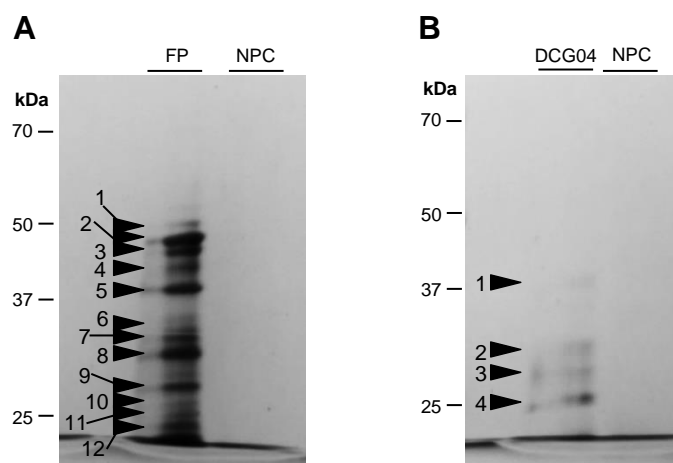


Figure D.IV-3: Detection of SHs (A) and PLCPs (B) labelled with FP-biotin and DCG04 in a senescent cotyledon of oilseed rape (cv. Ténor) after 5 days of LN treatment. To characterize SHs and PLCPs observed on the figures D.IV-2 and D.IV-4, a pull-down of biotinylated proteins was performed after labelling with the biotin-tagged probes FP-biotin (A) and DCG04 (B). After SDS-PAGE, proteins were detected by staining with silver nitrate (for details see “Materials and Methods”). NPC corresponds to the no probe controls. Black arrowheads correspond to the excised zones.

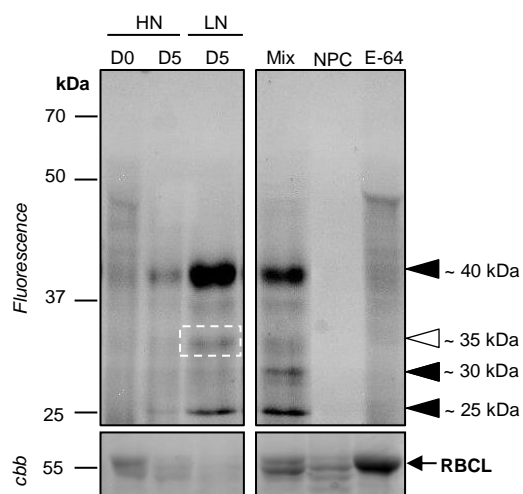
Table D.IV-1: Identifications of CPs and SPs labelled with the biotin-tagged probe DCG04 and FP respectively in a senescing cotyledon of oilseed rape (cv. Ténor) after 5 days of nitrate limitation by LC-MS/MS. The assigned protein with the best match is provided alongside the GenBank accession number. Proteases were classified according to Richau *et al.* (2012) for CPs and MEROPS database for SPs.

Protein accession no [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no.	Classification
<i>Cysteine proteases</i>	
BnaA08g04080D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674916168	RD21-like
BnaA10g05390D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674926680	RD21-like
PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [<i>Brassica napus</i>] / gi 923896233	RD21-like
BnaA06g36920D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674910774	RD21-like
senescence-specific cysteine protease [<i>Brassica napus</i>] / gi 5823018	SAG12-like
<i>Serine proteases</i>	
PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 49 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923758772	S10
BnaA06g18620D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674934323	S10
BnaA01g06330D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674904822	S10
BnaA10g23100D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674963729	S10
PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923844617	S10
BnaCnng56420D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674865197	S10
PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923512696	S10
BnaA04g07190D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674893092	S10
PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923923220	S10
BnaA08g12880D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674909794	S10
BnaA04g16130D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674902461	S10
PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 20 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923826505	S10
PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923682725	Subtilisin S8
PREDICTED: protease Do-like 1, chloroplastic [<i>Brassica napus</i>] / gi 923651657	Deg protease

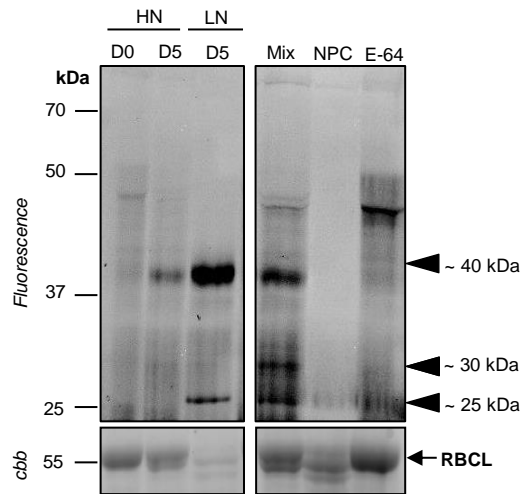
days of LN treatment (**Figure D.IV-3, Table D.IV-1 and Sup Table D.IV-S1**). The labelling allowed detecting 12 bands of active SHs between 50 and 20 kDa (**Figure D.IV-3**) and bands were identified by LC-MS/MS (**Table D.IV-1; Sup Table D.IV-S1**). We identified 14 serine proteases corresponding to 12 carboxypeptidases (S10), 1 subtilisin-like protease (S8) and 1 Deg-protease. Moreover, others SHs were identified corresponding to 4 lipases, 4 carboxyl-esterases (CXE), 1 pectin-acetylerase (PAE), 4 methyl-esterases (MES) and 2 thiol-esterases (**Sup Table D.IV-S1**). Interestingly, belong to the 14 identified serine proteases, 10 of them were also identified as active proteases during the sequential leaf senescence of oilseed rape ([Poret *et al.*, submitted](#) (§ D.III)). As observed for leaf senescence, the activity of SHs was also increased during the senescence of cotyledons associated to a LN treatment regardless of the genotype. Moreover, many activities of serine proteases implicated in the leaf senescence of Ténor were also found during the senescence of cotyledons. Based on these results, this type of senescence could be a promising model to study proteases associated to leaf senescence. However, genotypic differences observed between Ténor and Samouraï during leaf senescence was not observed during the senescence of cotyledons. That is why, SPs activities seem not to be the best target allowing the distinction between genotypes at the cotyledon stage.

Using the labelling of CPs with MV201, it was observed that the total specific PLCPs activity was significantly increased between 0 and 5 days particularly under LN condition for both genotypes (2.6 fold for Ténor and 2.4 fold for Samouraï; **Figure D.IV-4B**). Indeed, activities at ~40, ~30 increased during senescence between D0 and D5 while a new activity appeared at ~25 kDa under LN conditions in Ténor and Samouraï cotyledons (**Figure D.IV-4A**). Moreover, under LN supply, Ténor was characterized by the apparition of a new proteolytic activity at ~35 kDa compared to Samouraï (**Figure D.IV-4A**). The increase of PLCPs activities was significantly correlated with the decrease of soluble proteins observed on the **Figure 1C** ($r = -0.827$; $p\text{-value} < 0.0001$). It was already shown that several CPs were expressed in cotyledons. Indeed, genes encoding CPs were up-regulated during the development of cotyledons of soybean and common bean ([Yamauchi, 2007](#); [Brown and Hudson, 2015](#)). Moreover, γ and α VPEs (vacuolar processing enzymes) were expressed in *Arabidopsis thaliana* cotyledons particularly 17 days after germination ([Kinoshita *et al.*, 1999](#)) while cysteine proteases accumulated to high levels only in the yellowing cotyledons in upland cotton ([Shen *et al.*, 2006](#)). In leaves of oilseed rape, many PLCPs activities increased during senescence particularly in response to nitrate limitation ([Poret *et al.*, 2016](#)) and a recent study showed that Ténor was characterized by a higher total PLCPs activity than Samouraï related to the apparition of new cysteine proteases activities (RD21-like, RD19-like, SAG12-like, cathepsin-B, XBCP3-like and aleurain-like proteases) ([Poret *et al.*, submitted](#) (§ D.III)). Interestingly, as in senescent leaves, senescing cotyledon of Ténor presented additional CPs activity compared to Samouraï.

A. Ténor



B. Samourai



C

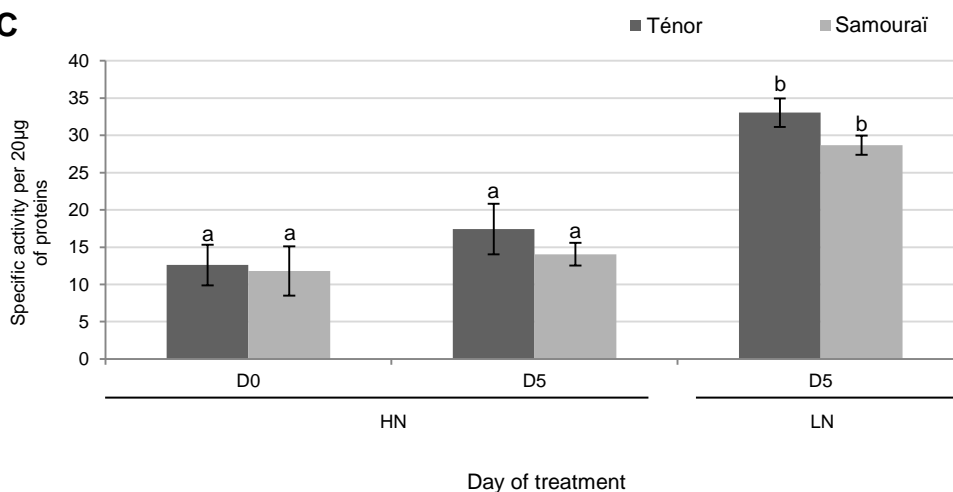


Figure D.IV-4: PLCP activities at pH 5.5 during the senescence of cotyledons of two genotypes of oilseed rape supplied with high (HN) or low (LN) nitrate during 5 days. Soluble proteins of cotyledons were extracted from Ténor or Samourai plants after 0 and 5 days of treatment HN (3.75 mM NO₃⁻) or LN (0.375 mM NO₃⁻). A labelling of protease activity was carried out with MV201 (specific fluorescent probe of PLCPs, pH 5.5, 4 h labelling). After SDS-PAGE, the fluorescence was detected by a scanner (A: Ténor; B: Samourai). As control, Mix corresponds to a mix of 0 and 5 days extracts (HN and LN) in the presence of MV201, NPC corresponds to the same mix in absence of MV201 (no probe control) and E-64 corresponds to the same mix in presence of MV201 and E-64 (specific inhibitor of PLCPs). The total amount of input proteins after incubation is represented by the protein gel stained by coomassie brilliant blue (cbb). Positions of active proteases were represented by black arrowheads. White square and arrowhead focused on a new activity of PLCPs during senescence in Ténor but not in Samourai. PLCPs global activity characterized by the fluorescence intensity was calculated by the software Image J® (C). The presented gel is representative of three biological replicates. Vertical bars correspond to ± SD of the mean (n=3). Letters represent the statistics (P < 0.05, ANOVA, Newman-Keuls test).

In order to identify labelled CPs (**Figure D.IV-4**), an activity-dependent labelling with DCG04 followed by a pull-down of biotinylated proteins was performed on cotyledon of Ténor after 5 days of LN treatment (**Figure D.IV-3, Table D.IV-1 and Sup Table D.IV-S2**). The DCG04-labelling allowed detecting 4 bands of active PLCPs between 37 and 25 kDa (**Figure D.IV-3**). Five active PLCPs were identified by LC-MS/MS (**Table D.IV-1 and Sup Table D.IV-S2**) and corresponded to 4 RD21-like proteases and 1 SAG12-like protease according to the classification of Richau *et al.*, (2012) (**Table D.IV-1 and Sup Table D.IV-S2**). All of these active proteases were also identified during the leaf senescence under LN treatment in oilseed rape (Poret *et al.*, submitted (§ D.III), cv. Ténor).

Moreover, activities at ~35 kDa in Ténor compared to Samouraï were associated to 3 different RD21-like proteases (BnaA06g36920D [*Brassica napus*] / gi|674910774; BnaA10g05390D [*Brassica napus*] / gi|674926680; BnaA08g04080D [*Brassica napus*] / gi|674916168). Interestingly, 2 of these (BnaA10g05390D [*Brassica napus*] / gi|674926680; BnaA08g04080D [*Brassica napus*] / gi|674916168) were also identified during the sequential leaf senescence of oilseed rape induced with N limitation in Ténor but not in Samouraï (Poret *et al.*, submitted (§ D.III)). However, the induction of specific CP activity was observed in senescing cotyledon of Ténor compared to Samouraï. Interestingly, the same induced-active proteases were characteristic of the genotype Ténor during both senescence of cotyledons and leaves and were associated to the higher NRE of Ténor compared to Samouraï during the sequential leaf senescence.

These results showed that, even if there is no physiological difference between genotypes during the senescence of cotyledons, the PLCPs associated to the high leaf NRE in Ténor is found at an early stage of development. Contrary to SPs, the study of CPs activities seems to be a promising way allowing the distinction between genotypes with contrasted proteolysis machinery and NRE at the cotyledon stage. Furthermore, it will be necessary to investigate a large screening of CPs activities during the senescence of cotyledons in many genotypes characterized by contrasted NRE at the leaf level to confirm these results.

D.IV.3.b Phytohormonal regulation of proteases activity during senescence in cotyledons

Based on results presented above, the cotyledon may provide an excellent experimental system to study senescence processes and their regulation systems like for others species as upland cotton, soybean and cucumber (Ling *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2006; Bangerth, 2015). Moreover, during leaf senescence associated to a N limitation, the high NRE of the genotype Ténor was characterized by an higher hormonal ratio ($[\text{SA}] + [\text{ABA}] / [\text{CKs}]$) promoting senescence that was correlated to higher proteolysis and proteases activities compared to Samouraï (Poret *et al.*, submitted (§ D.III)). In order to validate the putative role of SA and ABA on the regulation of proteases activity during leaf senescence, infiltrations of exogenous SA or

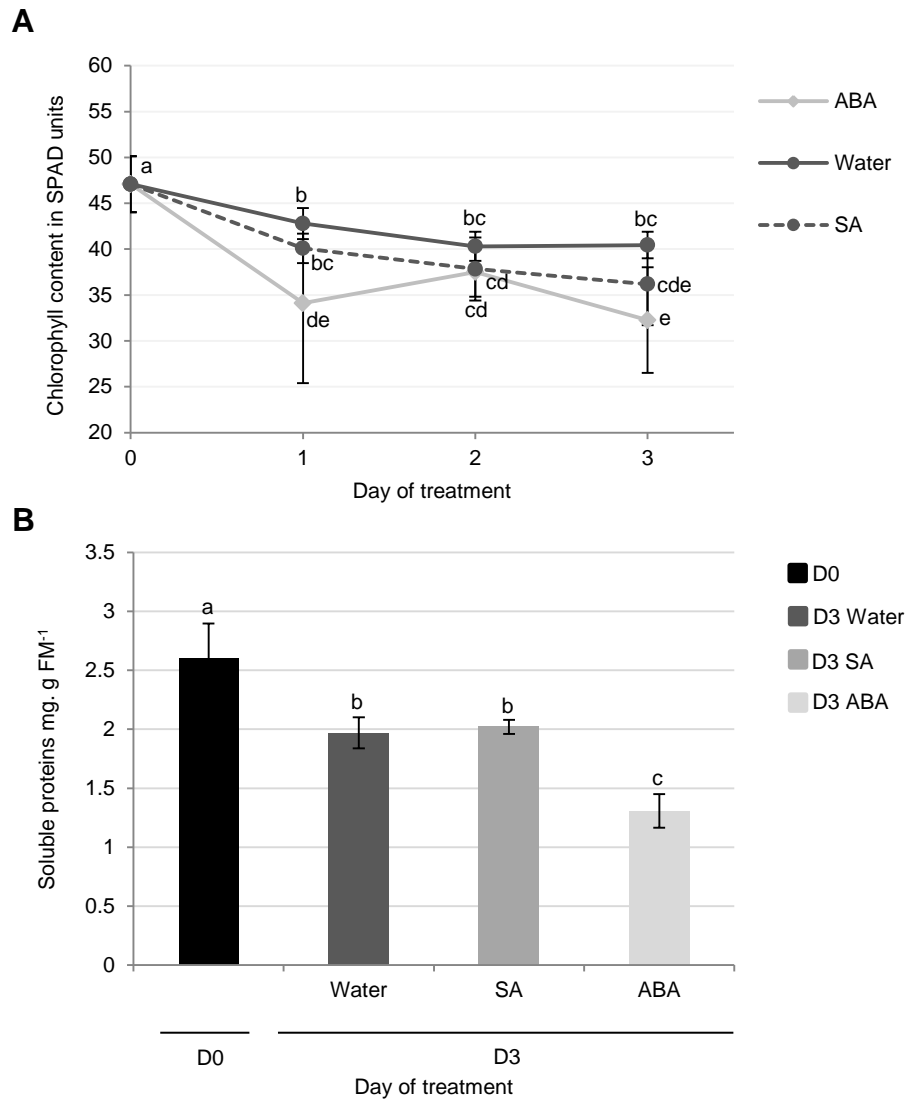


Figure D.IV-5: Chlorophyll (A) and soluble protein (B) contents of cotyledons in oilseed rape (cv. Ténor) at 0 or 3 days after water, SA or ABA infiltrations. Plants (20 days old) were infiltrated with 1 mL of water, salicylic acid (SA, 500 μ M) or abscisic acid (ABA, 50 μ M). The infiltration was performed on the abaxial surface of the cotyledon with a needleless syringe by simple pressure. Vertical bars correspond to \pm SD of the mean (n=3). Letters represent the statistics ($P < 0.05$, ANOVA, Newman-Keuls test).

ABA were carried out on mature cotyledons of Ténor and physiological and proteolysis modifications were studied 3 days after infiltrations.

D.IV.3.b.1 Effects of ABA infiltrations of the senescence of cotyledons

The promoter role of ABA during senescence has been demonstrated many times in various species (Weaver *et al.*, 1998; He *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2007; Breeze *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011; Zhang and Gan, 2012). Indeed, many genes involved in the synthesis of the ABA or ABA-related signal are overexpressed during senescence (Breeze *et al.*, 2011) while the endogenous levels of ABA increasing during senescence in several species as *Arabidopsis thaliana* or maize (He *et al.*, 2005; Breeze *et al.*, 2011).

Results showed that chlorophyll content strongly decrease during the senescence of cotyledons 3 days after an infiltration of ABA (-31%) compared with control (water infiltration, -14%) (Figure D.IV-5A). It was also demonstrated that exogenous application of ABA (75µM) resulted in the decrease of chlorophyll content and the repression of the transcription of chloroplast genes in *Hordeum vulgare* leaves (Yamburenko *et al.*, 2013). Moreover, several mutants of *Arabidopsis thaliana* insensitive to ABA presented a stay-green phenotype without degradation of chlorophylls (Lee *et al.*, 2011; Zhang and Gan, 2012).

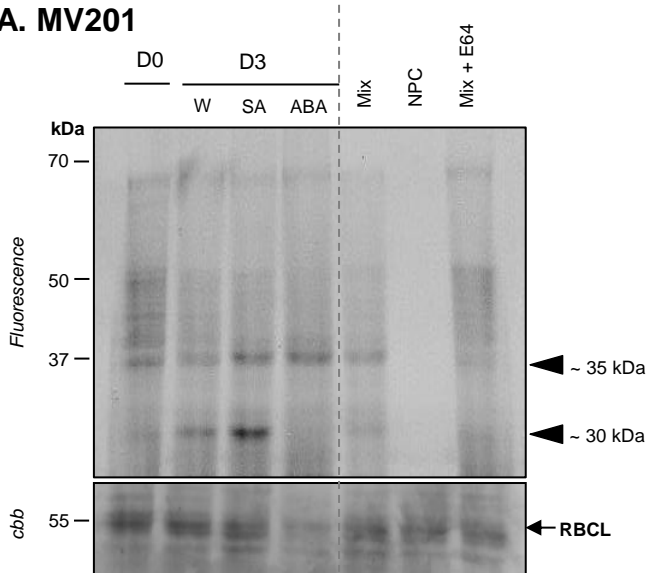
Soluble protein contents decrease during the senescence of cotyledons after 3 days) particularly after an infiltration of ABA (-49% vs only -24% in control) (Figure D.IV-5B). This high rate of proteolysis in response to ABA is mainly due to the strong degradation of the large sub-unit of RuBisCO (Figure D.IV-6). These observations are consistent with the fact that an exogenous application of ABA induced a diminution of protein content particularly RuBisCO in rice leaves (Fukuyama *et al.*, 2010).

Using the labelling of CPs with MV201, it was observed that while the total specific PLCPs remained stable during 3 days regardless of the infiltration (Figure D.IV-6B), activities of PLCPs at ~35 kDa were increased in response to ABA infiltrations (Figure D.IV-6A). It was already demonstrated that ABA application could provoked an enhancement of protease activities in rice leaves (Fukuyama *et al.*, 2010). Using the labelling of SHs with Fp-Rh, it was observed that the total specific SHs remained stable during 3 days after water or ABA infiltration and that no specific SH was increased after ABA infiltration (Figure D.IV-6C-D).

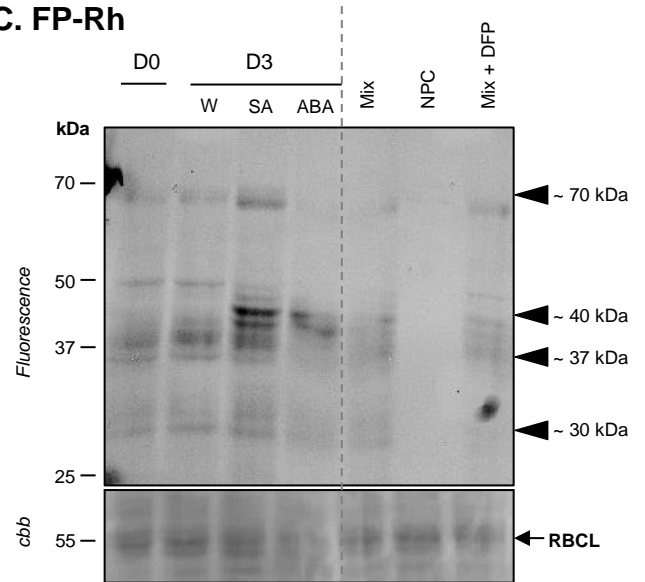
D.IV.3.b.2 Effects of SA infiltrations of the senescence of cotyledons of Ténor

Salicylic acid (SA) has a role of senescence accelerator (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; van der Graaff *et al.*, 2006; Morris *et al.*, 2010; Jibrán *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2014). Indeed, during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*, the concentration of SA increases (Khan *et al.*, 2014) and many genes involved in the synthesis of SA are induced (van der Graaff *et al.*, 2006).

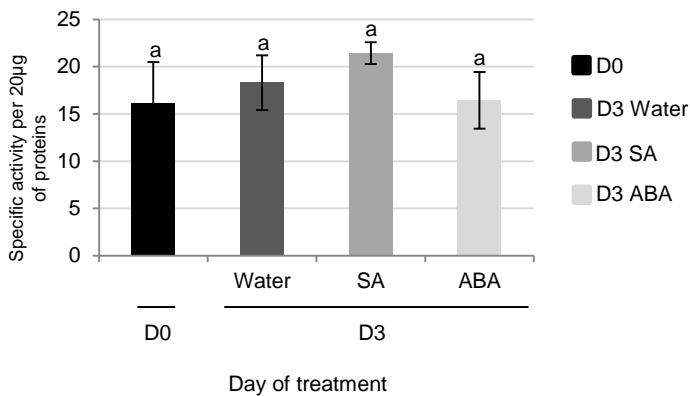
A. MV201



C. FP-Rh



B



D

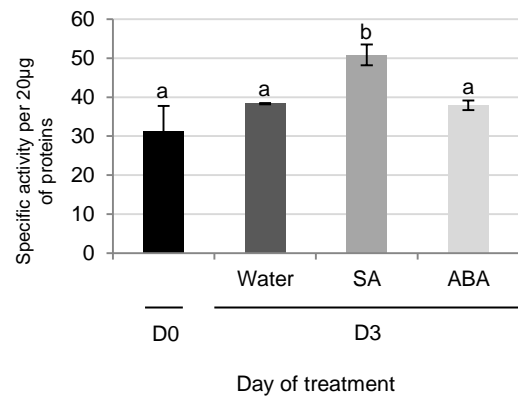


Figure D.IV-6: PLCPs and SHs activities of cotyledons of oilseed rape (cv. Ténor) at 0 or 3 days after water, SA or ABA infiltrations. Plants (20 days old) were infiltrated with 1 mL of water, salicylic acid (SA, 500 µM) or abscisic acid (ABA, 50 µM). Soluble proteins of cotyledons were extracted from Ténor plants after 0 and 3 days of treatment by infiltrations. A labelling of protease activity was carried out with MV201 or FP-Rh (specific fluorescent probes of PLCPs and SHs respectively, pH 5.5, 4h labelling for MV201 and pH 7.5; 1h labelling for FP-Rh). After SDS-PAGE, the fluorescence was detected by a scanner (A: PLCPs; C: SHs). As control, Mix corresponds to a mix of 0 and 5 days extracts (HN and LN) in the presence of MV201 or FP-Rh. NPC corresponds to the same mix in absence of MV201 or FP-Rh (no probe control). Moreover, competition experimentation was performed with the same mix in presence of E-64 or DFP corresponding to specific inhibitors of PLCPs or SHs respectively. The total amount of input proteins after incubation is represented by the protein gel stained by coomassie brilliant blue (cbb). Positions of active proteases were represented by black arrowheads. PLCPs or SHs global activity characterized by the fluorescence intensity was calculated by the software Image J® (C: PLCPs; D: SHs). The presented gels are representative of three biological replicates. Vertical bars correspond to ± SD of the mean (n=3). Letters represent the statistics (P < 0.05, ANOVA, Newman-Keuls test).

Compared to an ABA infiltration, results showed that an infiltration of exogenous SA in cotyledons did not induce physiological modifications associated to senescence. Indeed, the decreases of chlorophyll and soluble protein contents in cotyledons infiltrated with SA were not significantly different to control (water infiltration, **Figures D.IV-5A and D.IV-5B**). Using the labelling of CPs with MV201, it appears that the total specific PLCPs remained stable regardless of the infiltration (**Figure D.IV-6B**). Nevertheless, the activity of PLCPs at ~35 kDa was increased by SA infiltration and a new strong CP activity was specifically observed only after SA infiltration at ~30 kDa (**Figure D.IV-6A**). These results were consistent with several studies. Indeed, a exogenous treatment with SA in *Arabidopsis thaliana* enhanced the expression of *SAGs* genes (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Morris *et al.*, 2010) including genes encoding VPEs (α VPE and γ VPE) (Jibran *et al.*, 2013). Moreover, Morris *et al.* (2000) demonstrated that a defect in the synthesis of SA in *Arabidopsis thaliana* delayed senescence and repressed the gene expression of *SAG12* (encoding a cysteine protease). It was also reported that SA acted as a repressor of the cystatin expression (corresponding to one of the main CPs inhibitor) (Doares *et al.*, 1995).

Moreover, using the labelling of SHs with Fp-Rh, it was observed that the total specific activities of SHs was increased 3 days after SA infiltration (+ 62%) compared to water infiltration (+ 22%) (**Figure D.IV-6D**). This was particularly associated to the increase of SHs activities at ~70 kDa and ~ 40 kDa (**Figure D.IV-6C**). The up-regulation of genes encoding for serine proteases (including ATP-dependent Clp and a putative serine protease) was already shown in seedling leaves of sorghum after a SA application (Salzman *et al.*, 2005). As reported in leaf senescence of oilseed rape or other species, it appears that ABA and SA are able to modulate the proteolysis processes observed during the cotyledon senescence, suggesting that ABA and SA may have a generic role in the regulation of N remobilization of the different kinds of senescence.

D.IV.4 Conclusion

Regardless of the genotype, this study demonstrated that the senescence of cotyledons in oilseed rape was characterized by a decrease of chlorophyll and soluble proteins contents correlated to an increase of SHs and CPs activities particularly in response to N limitation. These modifications and many identified CPs/SPs were also observed during leaf senescence of oilseed rape (Girondé *et al.*, 2015b, 2016; Poret *et al.*, 2016, submitted (§ D.III)), meaning that the cotyledon may provide a promising experimental system to study the proteolysis machinery associated with senescence processes as well as regulation of senescence.

Even if Ténor was characterized by an higher NRE during the sequential leaf senescence associated to a N limitation compared to Samourai (Girondé *et al.*, 2015a, 2016), no differences

were observed for the yellowing or the protein contents during the senescence of cotyledons between both genotypes. However, 2 RD21-like proteases characteristic of the higher protein degradation of Ténor compared to Samourai were detected in leaves and cotyledons during senescence. That is why, contrary to SPs, the study of PLCPs activities by ABPP methods seems to be a promising tool to distinguish genotypes with contrasted NRE at an early stage of development as cotyledon stage in a larger scale.

Using cotyledon model on the genotype Ténor, it was demonstrated that an infiltration of ABA decreases the chlorophyll and soluble protein contents and induces several PLCPs activities while the infiltration of SA do not induce modifications of physiological senescence parameters but increases the activities of 2 PLCPs and several SHs. The specific impacts of ABA and SA on the proteolysis machinery involved in the senescence of cotyledons are also reported when leaf senescence is induced by N limitation, a treatment that leads to increase the ABA and SA contents in the senescing leaf of Ténor (Poret *et al.*, 2016, submitted (§ D.III)). Overall data suggest that the study of protease activities during senescence of cotyledons is a promising experimental model system to investigate the genotypic variability for contrasted NRE and the regulation of proteolysis machinery involved in a high NRE.

Supplemental material

Supplemental Table D.IV-S1: Identified SHs labelled with FP-biotin in senescent cotyledons of oilseed rape (cv. Ténor) at 5 days after LN treatment. To characterize SHs observed on the **Figure D.IV-2**, a labelling with FP-biotin was performed and followed by a pull-down of biotinylated proteins (**Figure D.IV-3**). LC-MS/MS spectra were searched against the *Viridiplantae* database focused on *Brassica napus* L. using MASCOT 2.5.0 and only scores higher or equal to 41 were considered. The assigned protein of best match is provided alongside the GenBank accession number. Score, queries matched, peptide matches, different peptide matches, experimental mass and theoretical mass are also presented. Others proteins identified in *Brassica napus* with the same peptides by MASCOT were also presented. Protein sequences were matched against sequences of *Brassicaceae* proteins using the NCBI Blast Protein Database (algorithm blastp) and better results of blasts are presented with the name of the protein, the organism, the gene accession number and the percentage of sequence identity. Finally, SHs were classified according to the MEROPS database.

Supplemental Table D.IV-S2: Identified CPs labelled with DCG04 in senescent cotyledons of oilseed rape (cv. Ténor) at 5 days after LN treatment. To characterize CPs observed on the **Figure D.IV-4**, a labelling with DCG04 was carried out and followed by a pull-down of biotinylated proteins (**Figure D.IV-3**). LC-MS/MS spectra were searched against the *Viridiplantae* database focused on *Brassica napus* L. using MASCOT 2.5.0 and only scores higher

or equal to 41 were considered. The assigned protein of best match is provided alongside the GenBank accession number. Score, queries matched, peptide matches, different peptide matches, experimental mass and theoretical mass are also presented. Others proteins identified in *Brassica napus* with the same peptides by MASCOT were also presented. Protein sequences were matched against sequences of *Brassicaceae* proteins using the NCBI Blast Protein Database (algorithm blastp) and better results of blasts are presented with the name of the protein, the organism, the gene accession number and the percentage of sequence identity. Finally, CPs were classified according to the classification of [Richau et al. \(2012\)](#).

Acknowledgements

This work was funded by the French National Research Agency (ANR-11-BTBR-004 RAPSODYN - Investments for the Future: Optimisation of the RAPESeed Oil content and Yield under low Nitrogen input) and by a Ph.D. grant to Mrs Marine Poret from the French Ministry of Research and the PhD Doctoral School (EDNBISE, Ecole Doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement). Further financial support was provided by ERA-IB project "PRODuCE", the Max Planck Society, COST CM1004 and the University of Oxford. The authors would like to thank Dr. Nathalie Nési, INRA (UMR 1349 Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, INRA, Agrocampus Ouest, Université de Rennes) who is the leader of this ANR-program, and the UMR EVA technical staff for their skillful assistance. The authors also wish to acknowledge Dr Laurence Cantrill for proofreading and English correction. The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Supplemental Table D.IV-S1: Identified SHs labelled with FP-biotin in senescent cotyledons of oilseed rape (cv. Ténor) at 5 days after LN treatment. To characterize SHs observed on the Figure D.IV-2, a labelling with FP-biotin was performed and followed by a pull-down of biotinylated proteins (Figure D.IV-3). LC-MS/MS spectra were searched against the *Viridiplantae* database focused on *Brassica napus* L. using MASCOT 2.5.0 and only scores higher or equal to 41 were considered. The assigned protein of best match is provided alongside the GenBank accession number. Score, queries matched, peptide matches, different peptide matches, experimental mass and theoretical mass are also presented. Others proteins identified in *Brassica napus* with the same peptides by MASCOT were also presented. Protein sequences were matched against sequences of Brassicaceae proteins using the NCBI Blast Protein Database (algorithm blastp) and better results of blasts are presented with the name of the protein, the organism, the gene accession number and the percentage of sequence identity. Finally, SHs were classified according to the MEROPS database.

Cutting zone (kDa)	Protein accession no [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no.	Score	Queries Matched	Peptides matched	Different matched peptides	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Theo. pI	Others proteins identified with the same peptides by MASCOT	Result of BLAST Protein [<i>Brassica napus</i>]-Protein [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no. / % identity	Result of BLAST Protein [<i>Brassica napus</i>]-Protein [organism] / NCBI accession no. / % identity	Classification
1 (70)	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 49 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923758772	100	12	6	5	58335	58372.2	5.03	-	BnaC01g38630D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674875924 / 97%	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 49 [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922404380 / 98 %	S10
	BnaCnng62410D, partial [<i>Brassica napus</i>] / gi 674861417	81	5	4	3	34584	34605.51	8.59	-	PREDICTED: GDSL esterase/lipase 3-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923927359 / 96 %	PREDICTED: GDSL esterase/lipase 3-like [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922445900 / 98 %	Lipase
	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923682725	77	5	4	4	73353	73398.89	7.57	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923688592	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923688592 / 99 %	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922567705 / 99 %	Subtilisin S8
	BnaA06g18620D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674934323	59	2	2	2	56843	56878.91	5.35	-	-	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 48 [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685320499 / 99 %	S10
	BnaA01g06330D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674904822	54	2	2	2	53488	53521.41	5.43	BnaA01g06320D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674904823 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923505359 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923505363 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923923220	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923505363 / 99 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685257732 / 98 %	S10
2 (65)	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 49 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923758772	62	5	5	5	58335	58372.2	5.03	-	BnaC01g38630D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674875924 / 97%	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 49 [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922404380 / 98 %	S10
3 (60)	BnaC03g52990D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674955644	90	4	4	4	34316	34337.89	5.23	-	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923844667 / 95 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922431256 / 95 %	CXEs
	BnaA10g23100D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674963729	71	10	4	4	53907	53941.01	6.43	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923844617 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923888443	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923888443 / 100 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685379438 / 99 %	S10
	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923682725	61	5	4	4	73353	73398.89	7.57	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923688592	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923688592 / 99 %	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gi 922567705 / 99 %	Subtilisin S8

Supplemental Table D.IV-S1: Continued

Cutting zone (kDa)	Protein accession no [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no.	Score	Queries Matched	Peptides matched	Different matched peptides	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Theo. pI	Others proteins identified with the same peptides by MASCOT	Result of BLAST Protein [<i>Brassica napus</i>]-Protein [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no. / % identity	Result of BLAST Protein [<i>Brassica napus</i>]-Protein [<i>organism</i>] / NCBI accession no. / % identity	Classification
4 (55)	BnaC02g17620D [<i>Brassica napus</i>] / gij674900403	195	12	8	8	48149	48180.03	7.2	PREDICTED: alpha-L-fucosidase 3-like [<i>Brassica napus</i>] / gij923758496	PREDICTED: alpha-L-fucosidase 3-like [<i>Brassica napus</i>] / gij923527799 / 96 %	PREDICTED: alpha-L-fucosidase 3-like [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gij922429895 / 99 %	Lipase
	PREDICTED: pectin acetyltransferase 11- like [<i>Brassica napus</i>] / gij923543348	185	12	9	8	42177	42260.42	8.84	-	PREDICTED: pectin acetyltransferase 11 [<i>Brassica napus</i>] / gij923902963 / 98 %	PREDICTED: pectin acetyltransferase 11 isoform X1 [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gij922429757 / 98 %	PAE
	BnaA02g13390D [<i>Brassica napus</i>] / gij674920607	186	12	8	8	48820	48851.72	6.69	PREDICTED: alpha-L-fucosidase 3-like [<i>Brassica napus</i>] / gij923527799	PREDICTED: alpha-L-fucosidase 3-like [<i>Brassica napus</i>] / gij923527799 / 99 %	PREDICTED: alpha-L-fucosidase 3-like [<i>Brassica rapa</i>] / gij685273064 / 99 %	Lipase
	PREDICTED: GDSL esterase/lipase At3g05180 [<i>Brassica napus</i>] / gij923631215	165	9	7	7	41823	42247.84	6.44	-	PREDICTED: GDSL esterase/lipase At3g05180-like [<i>Brassica napus</i>] / gij923926933 / 75 %	PREDICTED: GDSL esterase/lipase At3g05180-like [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gij922480806 / 99 %	Lipase
	PREDICTED: serine carboxypeptidase- like 35 [<i>Brassica napus</i>] / gij923844617	146	22	7	6	54114	54148.29	6.83	-	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [<i>Brassica napus</i>] / gij923888443 / 96 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gij922568661 / 99 %	S10
	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [<i>Brassica napus</i>] / gij923682725	125	8	6	6	73353	73398.89	7.57	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [<i>Brassica napus</i>] / gij923688592	PREDICTED: subtilisin- like protease SBT1.7 [<i>Brassica napus</i>] / gij923688592 / 99 %	PREDICTED: subtilisin- like protease SBT1.7 [<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>] / gij922567705 / 99 %	Subtilisin S8
	BnaA06g19010D [<i>Brassica napus</i>] / gij674894935	103	6	5	5	35528	35550.37	5.16	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [<i>Brassica napus</i>] / gij923844667	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [<i>Brassica napus</i>] / gij923844667 / 96 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [<i>Brassica rapa</i>] / gij685320048 / 99 %	CXEs
	PREDICTED: probable carboxylesterase 12, partial [<i>Brassica napus</i>] / gij923533496	84	5	4	4	29451	29469.5	5.38	-	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [<i>Brassica napus</i>] / gij923844667 / 99 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [<i>Brassica rapa</i>] / gij685320048 / 99 %	CXEs

Supplemental Table D.IV-S1: Continued

Cutting zone (kDa)	Protein accession no [Brassica napus] / NCBI accession no.	Score	Queries Matched	Peptides matched	Different matched peptides	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Theo. pI	Others proteins identified with the same peptides by MASCOT	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [Brassica napus] / NCBI accession no. / % identity	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [organism] / NCBI accession no. / % identity	Classification
5 (50)	BnaA06g19010D [Brassica napus] / gi 674894935	360	24	12	11	35528	35550.37	5.16	-	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gi 923844667 / 96 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica rapa] / gi 685320048 / 99 %	CXEs
	PREDICTED: protease Do-like 1, chloroplastic [Brassica napus] / gi 923651657	81	5	5	5	46206	46234.66	6	-	-	PREDICTED: protease Do-like 1, chloroplastic [Brassica rapa] / gi 685324648 / 99 %	Deg protease
	BnaA10g23100D [Brassica napus] / gi 674963729	61	4	3	3	53907	53941.01	6.43	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica napus] / gi 923844617 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica napus] / gi 923888443	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica napus] / gi 923888443 / 100 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica rapa] / gi 685379438 / 99 %	S10
	BnaCnng56420D [Brassica napus] / gi 674865197	55	2	2	2	12594	12601.54	9.51	-	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gi 923844667 / 77 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 13 [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922406938 / 100 %	S10
6 (45)	BnaA06g19010D [Brassica napus] / gi 674894935	129	10	10	5	35528	35550.37	5.16	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gi 923844667	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gi 923844667 / 96 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica rapa] / gi 685320048 / 99 %	CXEs
	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica napus] / gi 923682725	65	4	4	4	73353	73398.89	7.57	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica napus] / gi 923688592	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica napus] / gi 923688592 / 99 %	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922567705 / 99 %	Subtilisin S8
	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica napus] / gi 923844617	41	2	2	2	54114	54148.29	6.83	-	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica napus] / gi 923888443 / 96 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922568661 / 99 %	S10
7 (40)	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923512696	131	6	6	4	53001	53035	6.02	-	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923899898 / 98 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922431566 / 99 %	S10
	BnaA06g19010D [Brassica napus] / gi 674894935	122	7	7	5	35528	35550.37	5.16	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gi 923844667	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gi 923844667 / 96 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica rapa] / gi 685320048 / 99 %	CXEs
	BnaA01g06330D [Brassica napus] / gi 674904822	108	8	8	3	53488	53521.41	5.43	BnaA01g06320D [Brassica napus] / gi 674904823 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923505359 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923505363 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923923220	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923505363 / 99 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica rapa] / gi 685257732 / 98 %	S10
	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica napus] / gi 923844617	62	6	6	5	54114	54148.29	6.83	-	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica napus] / gi 923888443 / 96 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922568661 / 99 %	S10
BnaA04g07190D [Brassica napus] / gi 674893092	52	6	6	3	56619	56655.77	6.21	BnaC04g29380D [Brassica napus] / gi 674899250 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 20 [Brassica napus] / gi 923826505	BnaC04g29380D [Brassica napus] / gi 674899250 / 99 % ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 20 [Brassica napus] / gi 923826505 / 91 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 20 [Brassica rapa] / gi 685297745 / 97 %	S10	

Supplemental Table D.IV-S1: Continued

Cutting zone (kDa)	Protein accession no [Brassica napus] / NCBI accession no.	Score	Queries Matched	Peptides matched	Different matched peptides	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Theo. pI	Others proteins identified with the same peptides by MASCOT	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [Brassica napus] / NCBI accession no. / % identity	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [Brassica napus] / NCBI accession no. / % identity	Classification
8 (35)	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gij923923220	199	22	6	6	53413	53447.24	5.28	-	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gij923505363 / 97 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica oleracea var. oleracea] / gij922418008 / 99 %	S10
	BnaA01g06330D [Brassica napus] / gij674904822	165	20	6	6	53488	53521.41	5.43	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gij923505363	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gij923505363 / 99 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica rapa] / gij685257732 / 98 %	S10
	BnaA06g19010D [Brassica napus] / gij674894935	105	7	4	4	35528	35550.37	5.16	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gij923844667	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gij923844667 / 96 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica rapa] / gij685320048 / 99 %	CXEs
	PREDICTED: methylesterase 10-like [Brassica napus] / gij923552260	91	5	3	3	30212	30231.68	5.79	-	-	PREDICTED: methylesterase 10 [Brassica oleracea var. oleracea] / gij922522871 / 99 %	MEs
	BnaA08g12880D [Brassica napus] / gij674909794	79	3	3	3	53131	53164.05	5.87	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gij923512696 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gij923899898	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gij923899898 / 99 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica rapa] / gij685345711 / 98 %	S10
	BnaA04g16130D [Brassica napus] / gij674902461	78	3	3	3	51093	51125.51	6.74	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 51 [Brassica napus] / gij923610279 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 51 [Brassica napus] / gij923610302	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 51 [Brassica napus] / gij923610302 / 99 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 51 [Brassica rapa] / gij685300184 / 99 %	S10

Supplemental Table D.IV-S1: Continued

Cutting zone (kDa)	Protein accession no [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no.	Score	Queries Matched	Peptides matched	Different matched peptides	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Theo. pI	Others proteins identified with the same peptides by MASCOT	Result of BLAST Protein [<i>Brassica napus</i>]-Protein [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no. / % identity	Result of BLAST Protein [<i>Brassica napus</i>]-Protein [<i>organism</i>] / NCBI accession no. / % identity	Classification
9 (33)	BnaC01g01910D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674964800	315	20	9	9	28749	28768.08	5.23	-	PREDICTED: methyltransferase 9-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923503739 / 96 %	PREDICTED: methyltransferase 9-like [<i>Brassica oleracea</i> var. oleracea] / gi 922417442 / 98 %	MEs
	BnaA01g00900D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674958220	216	13	7	7	28614	28632.94	5.23	PREDICTED: methyltransferase 9-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923503739	PREDICTED: methyltransferase 9-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923503739 / 99 %	PREDICTED: methyltransferase 9-like [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685256421 / 99 %	MEs
	BnaA06g19010D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674894935	163	8	6	6	35528	35550.37	5.16	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923844667	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923844667 / 96 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685320048 / 99 %	CXEs
	PREDICTED: acyl-protein thioesterase 2-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923541437	98	4	4	4	26707	26723.43	6.15	PREDICTED: acyl-protein thioesterase 2-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923541441 ; PREDICTED: acyl-protein thioesterase 2-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923781182 ; BnaA03g07880D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674944794 ; BnaC03g09940D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674962907	PREDICTED: acyl-protein thioesterase 2-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923541441 / 99 %	PREDICTED: acyl-protein thioesterase 2 [<i>Brassica oleracea</i> var. oleracea] / gi 922440742 / 99 %	Thiol-esterase
	PREDICTED: probable carboxylesterase 12, partial [<i>Brassica napus</i>] / gi 923533496	96	6	5	5	29451	29469.5	5.38	-	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923844667 / 99 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685320048 / 99 %	CXEs
	BnaA01g06330D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674904822	91	5	2	2	53488	53521.41	5.43	BnaA01g06320D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674904823 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923505359 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923505363 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923923220	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923505363 / 99 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685257732 / 98 %	S10
	BnaA03g53710D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674890021	77	6	3	3	13001	130009.93	4.77	PREDICTED: methyltransferase 9-like isoform X1 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923618025 ; PREDICTED: methyltransferase 9-like isoform X2 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923618028	PREDICTED: methyltransferase 9-like isoform X2 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923618028 / 100 %	PREDICTED: methyltransferase 9-like [<i>Brassica oleracea</i> var. oleracea] / gi 922519135 / 97 %	MEs

Supplemental Table D.IV-S1: Continued

Cutting zone (kDa)	Protein accession no [Brassica napus] / NCBI accession no.	Score	Queries Matched	Peptides matched	Diferent matched peptides	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Theo. pI	Others proteins identified with the same peptides by MASCOT	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [Brassica napus] / NCBI accession no. / % identity	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [organism] / NCBI accession no. / % identity	Classification
10 (30)	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gi 923844667	298	22	22	9	35535	35557.41	5.24	-	BnaA06g19010D [Brassica napus] / gi 674894935 / 98 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica rapa] / gi 685320048 / 99 %	CXEs
	BnaA06g19010D [Brassica napus] / gi 674894935	295	22	22	9	35528	35550.37	5.16	-	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gi 923844667 / 96 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica rapa] / gi 685320048 / 99 %	CXEs
	BnaA01g06330D [Brassica napus] / gi 674904822	85	7	7	2	53488	53521.41	5.43	BnaA01g06320D [Brassica napus] / gi 674904823 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923505359 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923505363 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923923220	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923505363 / 99 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica rapa] / gi 685257732 / 98 %	S10
	BnaC01g01910D [Brassica napus] / gi 674964800	73	4	4	4	28749	28768.08	5.23	-	PREDICTED: methylesterase 9-like [Brassica napus] / gi 923503739 / 96 %	PREDICTED: methylesterase 9-like [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922417442 / 98 %	MEs

Supplemental Table D.IV-S1: Continued

Cutting zone (kDa)	Protein accession no [Brassica napus] / NCBI accession no.	Score	Queries Matched	Peptides matched	Different matched peptides	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Theo. pI	Others proteins identified with the same peptides by MASCOT	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [Brassica napus] / NCBI accession no. / % identity	Result of BLAST Protein [Brassica napus]-Protein [organism] / NCBI accession no. / % identity	Classification
11 (25)	BnaA06g19010D [Brassica napus] / gi 674894935	211	14	7	7	35528	35550.37	5.16	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gi 923844667	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica napus] / gi 923844667 / 96 %	PREDICTED: probable carboxylesterase 12 [Brassica rapa] / gi 685320048 / 99 %	CXEs
	BnaA01g06330D [Brassica napus] / gi 674904822	93	9	3	3	53488	53521.41	5.43	BnaA01g06320D [Brassica napus] / gi 674904823 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923505359 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923505363 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923923220	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923505363 / 99 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica rapa] / gi 685257732 / 98 %	S10
	BnaC01g01910D [Brassica napus] / gi 674964800	83	4	4	4	28749	28768.08	5.23	-	PREDICTED: methylesterase 9-like [Brassica napus] / gi 923503739 / 96 %	PREDICTED: methylesterase 9-like [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922417442 / 98 %	MEs
	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 20 [Brassica napus] / gi 923826505	55	4	3	3	57750	57787.39	6.32	-	BnaC04g29380D [Brassica napus] / gi 674899250 / 99 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 20 isoform X2 [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922459837 / 99 %	S10
	BnaA03g45270D [Brassica napus] / gi 674934756	51	3	2	2	54591	54625.41	5.39	-	BnaC07g37240D [Brassica napus] / gi 674939288 / 94 %	PREDICTED: acyl-protein thioesterase 1 isoform X2 [Brassica rapa] / gi 685292628 / 97 %	Thiol-esterase
12 (20)	BnaA01g06330D [Brassica napus] / gi 674904822	269	18	8	8	54488	53521.41	5.43	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923505363 ; PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923923220	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923505363 / 99 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica rapa] / gi 685257732 / 98 %	S10
	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 20 [Brassica napus] / gi 923826505	155	7	5	5	57750	57787.39	6.32	-	BnaC04g29380D [Brassica napus] / gi 674899250 / 99 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 20 isoform X2 [Brassica oleracea var. oleracea] / gi 922459837 / 99 %	S10
	BnaA10g23100D [Brassica napus] / gi 674963729	61	5	3	3	53907	53941.01	6.43	-	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica napus] / gi 923888443 / 100 %	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica rapa] / gi 685379438 / 99 %	S10

Supplemental Table D.IV-S2: Identified CPs labelled with DCG04 in senescent cotyledons of oilseed rape (cv. Ténor) at 5 days after LN treatment. To characterize CPs observed on the Figure 4, a labelling with DCG04 was carried out and followed by a pull-down of biotinylated proteins (Figure D.IV-3). LC-MS/MS spectra were searched against the *Viridiplantae* database focused on *Brassica napus* L. using MASCOT 2.5.0 and only scores higher or equal to 41 were considered. The assigned protein of best match is provided alongside the GenBank accession number. Score, queries matched, peptide matches, different peptide matches, experimental mass and theoretical mass are also presented. Others proteins identified in *Brassica napus* with the same peptides by MASCOT were also presented. Protein sequences were matched against sequences of Brassicaceae proteins using the NCBI Blast Protein Database (algorithm blastp) and better results of blasts are presented with the name of the protein, the organism, the gene accession number and the percentage of sequence identity. Finally, CPs were classified according to the classification of Richau *et al.* (2012).

Zone (kDa)	Protein accession no [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no.	Score	Queries Matched	Peptides matched	Different matched peptides	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Theo. pI	Others proteins identified with the same peptides by MASCOT	Result of BLAST Protein [<i>Brassica napus</i>]-Protein [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no. / % identity	Result of BLAST Protein [<i>Brassica napus</i>]-Protein [<i>organism</i>] / NCBI accession no. / % identity	Classification
1 (40)	BnaA08g04080D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674916168	161	7	7	6	50625	50657.9 5	5.23	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923729007 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923844324	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923729007	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica oleracea</i> var. oleracea] / gi 922553936 / 96 %	RD21-like
	BnaA10g05390D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674926680	158	10	10	6	50452	50484.7 6	5.3	-	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [<i>Brassica napus</i>] / gi 923896233 / 97 %	senescence-associated cysteine protease [<i>Brassica oleracea</i>] / gi 18141285 / 92 %	RD21-like
	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [<i>Brassica napus</i>] / gi 923896233	146	10	10	6	50534	50566.8 4	5.23	-	BnaA10g05390D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674926680 / 97 %	senescence-associated cysteine protease [<i>Brassica oleracea</i>] / gi 18141285 / 94 %	RD21-like
	BnaA06g36920D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674910774	64	3	3	2	50506	50539.0 7	5.57	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923652867 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923656414 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923721731 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like isoform X1 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923815285 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like isoform X2 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923815292	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923652867 / 99 %	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685326917 / 99 %	RD21-like
2 (35)	BnaA06g36920D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674910774	120	5	5	3	50506	50539.0 7	5.57	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923652867 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923656414 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923721731 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like isoform X1 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923815285 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like isoform X2 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923815292	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923652867 / 99 %	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685326917 / 99 %	RD21-like
	BnaA10g05390D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674926680	97	4	4	4	50452	50484.7 6	5.3	-	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [<i>Brassica napus</i>] / gi 923896233 / 97 %	senescence-associated cysteine protease [<i>Brassica oleracea</i>] / gi 18141285 / 92 %	RD21-like
	BnaA08g04080D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674916168	94	5	5	4	50625	50657.9 5	5.23	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923729007 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923844324	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923729007	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica oleracea</i> var. oleracea] / gi 922553936 / 96 %	RD21-like

Supplemental Table D.IV-S2: Continued

Zone (kDa)	Protein accession no [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no.	Score	Queries Matched	Peptides matched	Different matched peptides	Exp. Mass (Da)	Theo. Mass (Da)	Theo. pI	Others proteins identified with the same peptides by MASCOT	Result of BLAST Protein [<i>Brassica napus</i>]-Protein [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no. / % identity	Result of BLAST Protein [<i>Brassica napus</i>]-Protein [<i>organism</i>] / NCBI accession no. / % identity	Classification
3 (30)	BnaA08g04080D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674916168	74	3	3	3	50625	50657.95	5.23	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923729007 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923844324	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923729007	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica oleracea</i> var. oleracea] / gi 922553936 / 96 %	RD21-like
	BnaA10g05390D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674926680	71	3	3	3	50452	50484.76	5.3	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923633918	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [<i>Brassica napus</i>] / gi 923896233 / 97 %	senescence-associated cysteine protease [<i>Brassica oleracea</i>] / gi 18141285 / 92 %	RD21-like
4 (25)	senescence-specific cysteine protease [<i>Brassica napus</i>] / gi 5823018	143	8	8	7	38333	38357.54	6.99	PREDICTED: senescence-specific cysteine protease SAG12-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923761352	PREDICTED: senescence-specific cysteine protease SAG12-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923761352 / 99 %	PREDICTED: senescence-specific cysteine protease SAG12 [<i>Brassica oleracea</i> var. oleracea] / gi 922428544 / 98 %	SAG12-like
	BnaA10g05390D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674926680	68	5	5	4	50452	50484.76	5.3	-	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [<i>Brassica napus</i>] / gi 923896233 / 97 %	senescence-associated cysteine protease [<i>Brassica oleracea</i>] / gi 18141285 / 92 %	RD21-like
	BnaA08g04080D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674916168	63	4	4	4	50625	50657.95	5.23	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923729007 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923844324	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923729007	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica oleracea</i> var. oleracea] / gi 922553936 / 96 %	RD21-like
	BnaA06g36920D [<i>Brassica napus</i>] / gi 674910774	47	3	3	2	50506	50539.07	5.57	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923652867 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923656414 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like isoform X1 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923815285 ; PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like isoform X2 [<i>Brassica napus</i>] / gi 923815292	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a-like [<i>Brassica napus</i>] / gi 923652867 / 99 %	PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [<i>Brassica rapa</i>] / gi 685326917 / 99 %	RD21-like

Chapitre E
Discussion générale
& Perspectives



Chapitre E : Discussion générale & Perspectives

Le colza correspond à la seconde culture oléagineuse dans le monde après le soja (Carré et Pouzet, 2014) et sa culture connaît un regain d'intérêt grâce à des applications agro-alimentaires et industrielles qui ne cessent de se diversifier. Néanmoins, cette culture requiert une quantité importante de fertilisants N afin d'atteindre des rendements suffisants (Rathke *et al.*, 2005) et présente une faible efficacité d'usage de l'azote (EUA) (Schjoerring *et al.*, 2005). De plus, l'apport d'intrants N correspond au poste de dépense le plus important des plantes de grandes cultures (Rothstein, 2007) tandis qu'un apport excessif de N augmente considérablement les risques de pollution pour l'environnement. Ainsi, dans un contexte de réduction des intrants azotés, le défi majeur consiste à améliorer le bilan agroenvironnemental et la compétitivité de la culture de colza *via* l'optimisation de l'EUA.

Chez le colza, l'EUA lors des stades végétatifs est majoritairement limitée par une faible efficacité de remobilisation de l'azote foliaire (ERA) (Malagoli *et al.*, 2005a, b). De plus, une étude récente consistant à caractériser l'EUA, l'ERA et la sénescence de 10 génotypes de colza d'hiver au stade rosette cultivés en serre, a permis de mettre en évidence une variabilité génotypique de l'ERA (Girondé *et al.*, 2015a). Lors de cette étude, il a été démontré que les génotypes ayant une meilleure ERA présentaient également une plus forte capacité de dégradation des protéines solubles. Par ailleurs, lors des stades reproducteurs, l'EUA est premièrement limitée par une faible EAbA post-anthèse. Néanmoins, dans un contexte de limitation des fertilisants azotés, l'amélioration de cette composante ne sera pas suffisante pour améliorer l'EUA. De plus, malgré une remobilisation efficace du N des feuilles lors de ces stades (Malagoli *et al.*, 2005b ; Ulas *et al.*, 2013 ; Girondé *et al.*, 2015b), une forte remobilisation du N des tiges et des péricarpes semble également nécessaire. En effet, la plus forte EUA chez certains génotypes de colza de printemps serait associée à une plus forte remobilisation du N des feuilles mais également des tiges et des péricarpes (Balint et Rengel, 2011).

Face à ce contexte, les travaux de cette thèse se sont focalisés sur **la caractérisation des mécanismes protéolytiques associés à une remobilisation efficace des composés azotés lors de la sénescence des feuilles aux stades végétatifs et lors de la sénescence des siliques aux stades reproducteurs.**

Tableau E-1: Synthèse des modifications physiologiques et protéomiques associées à la sénescence foliaire séquentielle chez Aviso, Ténor et Samourai en réponse ou non à une limitation en N pendant 23 jours. Les données chiffrées représentent les % de dégradations ou le facteur de multiplication des variables entre 0 et 23 jours de traitement pour chaque variable étudiée. Les données chiffrées **en rouge** sont représentatives d'une différence significative entre 0-23 jours. Les données sous forme de lettres permettent de comparer les valeurs brutes moyennes à 23 jours entre les génotypes. Les lettres **en vert** sont représentatives d'une différence significative entre les traitements HN et LN. AALP: aleurain-like protease; PLCP: papain-like cysteine protease; SP: serine protease; VPE: vacuolar processing enzyme; HN: high nitrate; LN: low nitrate.

Variable étudiée	Traitement	Aviso		Ténor		Samourai	
Rappels des performances agronomiques des génotypes (Girondé et al., 2015a)	HN	ERA foliaire moyenne				ERA foliaire faible	
	LN	Forte ERA foliaire ; Maintien de la production de biomasse				Faible ERA foliaire ; Diminution de la production de biomasse	
Modifications biochimiques associées à la sénescence (Δ 0-23) - Statistiques des valeurs brutes à D23							
Δ Chlorophylles	HN	-26%	C	-38%	B	-16%	C
	LN	-59%	B	-82%	A	-51%	B
Δ Anthocyanes	HN	x 1,8	A	x 3,9	C	x 3,6	C
	LN	x 2,8	B	x 4,6	D	x 5,2	D
Δ Protéines solubles	HN	-58%	AB	-69%	D	-56%	CD
	LN	-80%	A	-85%	AB	-70%	BC
Modifications des activités protéasiques (Δ 0-23) - Statistiques des valeurs brutes à D23							
Δ Activité Protéasome	HN	x 1,2	A	x 1,4	A	x 1,3	A
	LN	x 2,4	AB	x 2,8	A	x 1,6	A
Δ Activité des SPs	HN	x 1,8	BC	x2,26	BC	x1,7	AB
	LN	x 2,23	CD	x3,57	D	x2,23	BC
Δ Activité PLCPs	HN	x 1,8	A	x 1,9	A	x 2,12	A
	LN	x 4,12	B	x 3,6	B	x 3,71	A
Δ Activité AALPs	HN	x 2,25	A	x 5,54	A	x 2,59	A
	LN	x 5,01	B	x 12,54	B	x 4,10	A
Δ Activité VPEs	HN	x 3,28	BC	x 4,5	AB	x 3,29	AB
	LN	x 7,9	D	x 7,04	C	x 9,18	C

E.I Caractérisation de la machinerie protéolytique impliquée dans la remobilisation efficiente du N chez le colza

E.I.1 Mise en évidence des activités protéasiques impliquées dans la remobilisation du N lors de la sénescence foliaire aux stades végétatifs

Comme décrit précédemment, l'ERA aux stades végétatifs est fortement associée à la capacité de dégradation des protéines solubles (Girondé *et al.*, 2015a). Ainsi, l'hypothèse principale de ce travail était que **les différences d'ERA entre ces génotypes pourraient être associées à des mécanismes protéolytiques différents lors de la sénescence.**

Pour cela, les modifications biochimiques ainsi que les activités protéasiques ont été étudiées lors de la sénescence séquentielle chez trois génotypes présentant des ERA contrastées (Aviso, Ténor et Samouraï) (**Tableau E-1**). En effet, d'après les travaux de Girondé *et al.*, (2015a), les génotypes Aviso et Ténor correspondent à des génotypes capables de maintenir leur production de biomasse en réponse à une limitation en nitrate grâce à une augmentation significative de l'ERA des feuilles. Au contraire, le génotype Samouraï présente une faible ERA quel que soit le niveau de fertilisation azotée et n'est pas capable de maintenir sa production de biomasse en réponse à une limitation en nitrate.

Quel que soit le génotype considéré, cette étude a permis de mettre en évidence qu'une limitation en N exacerbe les processus biochimiques associés à la sénescence tels que la dégradation des chlorophylles ou encore la production d'anthocyanes (**Tableau E-1**). De plus, Ténor et Aviso présentaient une dégradation significative des protéines solubles de l'ordre de 80-85% contre seulement 70% pour Samouraï (**Tableau E-1**), suggérant ainsi que les activités protéasiques associées à cette plus forte protéolyse foliaire chez Aviso et Ténor sont différentes de celles retrouvées dans les feuilles du génotype Samouraï.

Pour vérifier cette hypothèse, les activités protéasiques ont été déterminées grâce à une technique originale, l'ABPP pour « Activity-Binding Protein Profiling » (Morimoto et van der Hoorn, 2016). Cette technique permet, grâce à l'utilisation de sondes activité-dépendantes, de détecter les protéases actives d'une classe de protéase spécifique. Elle permet à la fois de suivre l'activité de la classe de protéase au cours du temps (sonde portant un tag fluorescent) mais également d'identifier les protéases à l'origine de ces activités (sonde portant un tag biotine).

Grâce à ces techniques, il a été observé, que, l'activité du protéasome (à pH 7,5) était maintenue tardivement quel que soit le génotype et le niveau de fertilisation azotée (**Tableau E-1**). Ainsi, l'activité du protéasome n'est pas à l'origine des différences génotypiques de dégradation des protéines solubles lors de la sénescence. Néanmoins, ces résultats confirment l'activité du protéasome lors de la sénescence foliaire chez le colza. Une augmentation de la

Tableau E-2: Synthèse des identifications protéasiques associées à la sénescence foliaire séquentielle chez Aviso et Ténor en réponse à une limitation en N pendant 23 jours. Les protéases en vert correspondent aux protéases retrouvées chez les deux génotypes. Les protéases dont la case est colorée en bleu correspondent aux protéases actives à 27 kDa chez Aviso et Ténor mais absentes chez Samourai. D: Day; PLCP: papain-like cysteine protease; POPLs: prolyl oligopeptidase-like protease; SCPLs: serine carboxypeptidase-like; AALP: aleurain-like protease; HN: high nitrate; LN: low nitrate.

Classe	Trait.	Aviso feuille sénescente		Ténor feuille sénescente	
		Protein accession no [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no.	Classe	Protein accession no [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no.	Classe
Sérine protéases	D23 LN	BnaC05g15670D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674888482	Subtilisins S8	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [<i>Brassica napus</i>] / gj 923682725	Subtilisins S8
		BnaA09g07410D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674914517	Subtilisins S8	BnaCnng41800D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674871280	Subtilisins S8
		BnaCnng55020D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674865926	Subtilisins S8		
		BnaA03g44620D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674934691	Subtilisins S8		
		BnaA08g30180D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674878293	POPLs S9	BnaA08g30180D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674878293	POPLs S9
		BnaC06g11680D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674926851	POPLs S9	BnaC06g11680D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674926851	POPLs S9
		BnaCnng28400D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674876980	POPLs S9	BnaCnng28400D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674876980	POPLs S9
		BnaC08g09650D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674896006	POPLs S9	PREDICTED: acylamino-acid-releasing enzyme-like isoform X1 [<i>Brassica napus</i>] / gj 923687883	POPLs S9
		BnaA06g02850D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674910247	POPLs S9	PREDICTED: prolyl endopeptidase-like [<i>Brassica napus</i>] / gj 923689449	POPLs S9
		BnaA09g04940D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674913439	POPLs S9	BnaCnng64630D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674859887	POPLs S9
		BnaA07g32380D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674946140	POPLs S9	PREDICTED: acylamino-acid-releasing enzyme-like [<i>Brassica napus</i>] / gj 923650996	POPLs S9
				PREDICTED: prolyl endopeptidase-like [<i>Brassica napus</i>] / gj 923644108	POPLs S9
				BnaA06g18620D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674934323	SCPLs S10
				BnaC01g38630D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674875924	SCPLs S10
				PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [<i>Brassica napus</i>] / gj 923844617	SCPLs S10
		BnaA04g07190D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674893092	SCPLs S10		
		BnaA01g06330D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674904822	SCPLs S10		
		PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [<i>Brassica napus</i>] / gj 923512696	SCPLs S10		
		BnaA08g12880D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674909794	SCPLs S10		
		PREDICTED: lysosomal Pro-X carboxypeptidase-like [<i>Brassica napus</i>] / gj 923647110	SCPLs S10		
		BnaA04g16130D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674902461	SCPLs S10		
		BnaA10g23100D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674963729	SCPLs S10		
		PREDICTED: protease Do-like 1, chloroplastic [<i>Brassica napus</i>] / gj 923651657	Deg		
PLCPs	D23 LN	Protein accession no [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no.	Classe	Protein accession no [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no.	Classe
		BnaA10g05390D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674926680	RD21-like	BnaA10g05390D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674926680	RD21-like
		BnaCnng42340D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674871100	RD21-like	BnaA08g04080D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674916168	RD21-like
				PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [<i>Brassica napus</i>] / gj 923896233	RD21-like
				BnaA06g36920D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674910774	RD21-like
		BnaC02g31910D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674945739	SAG12-like	senescence-specific cysteine protease [<i>Brassica napus</i>] / gj 5823018	SAG12-like
				BnaA06g40240D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674875014	SAG12-like
		BnaA06g05780D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674939790	XBCP3-like	BnaA06g05780D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674939790	XBCP3-like
				PREDICTED: low-temperature-induced cysteine proteinase-like isoform X2 [<i>Brassica napus</i>] / gj 923828698	XBCP3-like
				BnaA02g06390D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674924155	AALP-like
		BnaC09g35690D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674953141	AALP-like		
		PREDICTED: cysteine proteinase RD19a-like [<i>Brassica napus</i>] / gj 923844541	RD19-like		
		PREDICTED: cysteine proteinase RD19a [<i>Brassica napus</i>] / gj 923503374	RD19-like		
		BnaCnng01440D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674926134	Cathepsin-B		
		BnaA09g52180D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674874900	Cathepsin-B		
		BnaC01g26060D [<i>Brassica napus</i>] / gj 674965096	Zingipain		

sous-unité β 1 du protéasome avait également été observée chez le colza lors de la sénescence foliaire induite par une limitation/privation en N supposant son implication lors des processus de protéolyse associés à la sénescence (Desclos *et al.*, 2009).

Par ailleurs, il a été démontré que l'activité spécifique des hydrolases à sérine (à pH 7,5) était fortement augmentée lors de la sénescence foliaire particulièrement lors d'une limitation en N quel que soit le génotype considéré (**Tableau E-1**). Ces activités sont supérieures chez Ténor en comparaison à Samourai mais cette différence n'est pas retrouvée entre Aviso et Samourai. La forte protéolyse foliaire observée chez Aviso est associée à l'identification de 4 subtilisin-like (S8) et 7 POPLs (S9) actives (**Tableau E-2**). Chez Ténor, la plus forte dégradation protéique est associée à l'activité de 2 subtilisin-like (S8), 8 POPLs (S9) (dont 3 identiques avec Aviso) mais également de 10 carboxypeptidases et 1 Deg protéase (**Tableau E-2**). Chez le colza au stade rosette, Girondé *et al.* (2016) avaient également mis en évidence que la protéolyse efficace durant la sénescence foliaire était associée à une forte activité globale des SPs particulièrement en réponse à une limitation en N minéral. Néanmoins, le rôle des activités SPs dans les différences génotypiques de protéolyse reste à vérifier car seul Ténor présente une activité SPs supérieure à celle de Samourai et cela n'a pas été retrouvé chez Aviso.

L'implication des VPEs (protéases à cystéine) lors de la sénescence induite par une limitation en N chez le colza a été clairement mise en évidence en réponse à une limitation en N quel que soit le génotype considéré (Tableau E-1). L'implication des VPEs lors de la sénescence foliaire a déjà été démontrée chez *A. thaliana* (Sanmartín *et al.*, 2005 ; Rojo *et al.*, 2003). Ces protéases seraient impliquées dans la maturation des protéases vacuolaires et dans le recyclage des acides aminés (Rojo *et al.*, 2003, 2004 ; Nishimura et Hatsugai, 2011 ; Roberts *et al.*, 2012). De plus, cette activité est significativement supérieure chez Aviso en comparaison à Samourai. Néanmoins cette différence n'est pas retrouvée entre Ténor et Samourai. Ainsi le rôle de l'activité des VPEs dans les différences génotypiques de dégradation des protéines solubles reste à vérifier car seul Aviso présente une activité VPEs supérieure à celle de Samourai et cela n'a pas été retrouvé chez Ténor.

Enfin, cette étude a permis de démontrer que l'activité des protéases à cystéine (CPs) constituées principalement de PLCPs (incluant les AALPs) était fortement augmentée lors de la sénescence foliaire associée à une limitation en N particulièrement chez Aviso et Ténor par rapport à Samourai (**Tableau E-1**). Les protéases à l'origine de cette forte activité correspondent à des protéases RD21-like, SAG12-like, XBCP3-like et AALP-like chez Aviso et Ténor avec l'identification d'autres protéases actives de type RD19-like, cathepsin-B et zingipain

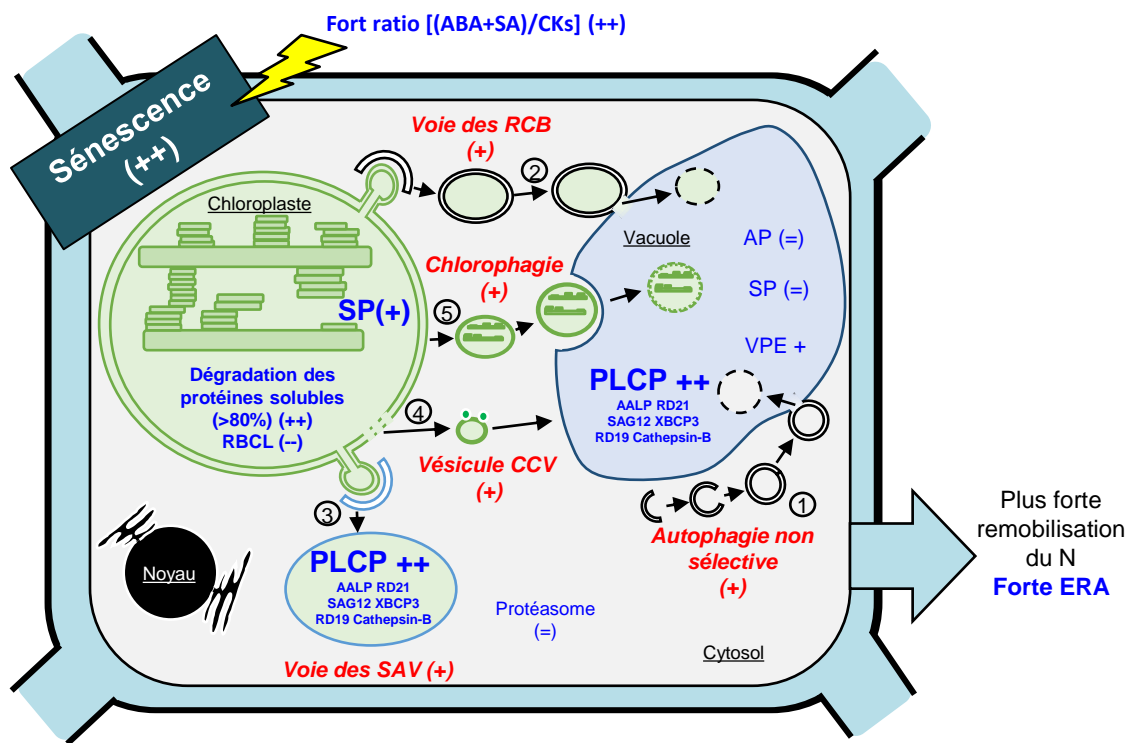


Figure E-1: Représentation schématique des modifications physiologiques et protéomiques cellulaires associées à la sénescence foliaire séquentielle chez un génotype présentant une forte efficacité de remobilisation en N (Aviso/Ténor) en réponse à une limitation en N pendant 23 jours. Les mécanismes représentés **en bleu** ont été observés lors de ces travaux de thèse. Les données représentées **en rouge** sont supposées. (+): augmentation pendant la sénescence (le nombre de + est proportionnel à l'effet) ; (-) diminution pendant la sénescence (le nombre de - est proportionnel à l'effet) ; (=): pas de changement pendant la sénescence; (?) non déterminé. AP: aspartic protease; AALP: aleurain-like protease; CCV: chloroplast vesiculation containing bodies; ERA: efficacité de remobilisation de l'azote; PLCP: papain-like protease; SAV: senescence associated vesicles; RCB: RuBisCO containing bodies; RBCL: large sous-unité de la RuBisCO; SP: serine protease; VPE: vacuolar processing enzyme.

chez Ténor (**Tableau E-2**). Toutes ces activités sont totalement absentes chez Samouraï. De plus, l'implication de SAG12 chez Ténor et non chez Samouraï a été vérifiée par western blot.

L'implication des CPs lors de la sénescence a déjà été démontrée chez le colza (Desclos *et al.*, 2009 ; Girondé *et al.*, 2015, 2016) mais également chez de nombreuses espèces (Martínez *et al.*, 2007 ; Roberts *et al.*, 2012 ; Diaz-Mendoza *et al.*, 2016). Cette classe de protéase est la plus fortement induite lors de la sénescence foliaire et semble fortement dédiée à la remobilisation du N lors de la sénescence (Havé *et al.*, 2016). En plus de leur rôle durant la sénescence, les CPs sont aussi particulièrement impliquées dans l'étape finale de la sénescence, la PCD. En effet, les VPEs, les métacaspases et les cathepsin-B sont supposés être les exécuteurs de la mort cellulaire programmée (Gallois *et al.*, 2007 ; Tsiatsiani *et al.*, 2011b ; Albertini *et al.*, 2014 ; Cai *et al.*, 2014 ; Hatsugai *et al.*, 2015 ; Ge *et al.*, 2016 ; Havé *et al.*, 2016). Sur la base de ces données et de nos résultats, l'activité des cathepsin-B retrouvée chez Ténor mais pas chez Samouraï pourrait être la preuve de l'induction plus précoce de la PCD chez ce génotype en réponse à une carence en N.

Par conséquent, l'identification de nombreuses activités CPs chez Ténor et Aviso qui sont totalement absentes chez Samouraï, suggère fortement que certaines de ces CPs sont indispensables pour optimiser le niveau de protéolyse lors de la sénescence foliaire induite par une limitation en N aux stades végétatifs chez le colza.

L'ensemble des travaux réalisés au stade rosette suggère que la machinerie protéolytique impliquée dans une remobilisation efficace des protéines lors de la sénescence des feuilles (**Figure E-1**) nécessite:

- une intervention du **protéasome** quel que soit le génotype et/ou le niveau d'alimentation en azote minéral.
- une implication de nombreuses **protéases à sérine**. Néanmoins, l'implication de ces protéases dans la variabilité génotypique de dégradation des protéines solubles est postulée mais reste à vérifier.
- une intervention des **VPEs** quel que soit le génotype mais particulièrement en réponse à une limitation en N. Leur implication dans la maturation d'autres classes de protéases est postulée. L'implication de ces protéases dans les variations génotypiques de dégradation des protéines solubles est postulée mais reste à vérifier.
- une forte implication des **PLCPs** quel que soit le génotype et plus particulièrement en réponse à une limitation en N chez Ténor et Aviso. **De nombreuses PLCPs actives telles des SAG12-, RD21-, RD19-, XBCP3-, AALP-like et des cathepsin-B ont été identifiées et semblent clairement associées à la variabilité génotypique de dégradation des protéines solubles.**

Le protéasome et les SPs sont physiologiquement actifs à pH neutre, ainsi leurs activités ont été étudiées à pH 7,5. Par ailleurs, les CPs étant principalement localisées dans la vacuole ou les SAVs (Otegui *et al.*, 2005 ; Martínez *et al.*, 2007), leur activité a été étudiée à pH 5.5. **Il a été démontré que les PLCPs chez le colza étaient actives à pH 5.5 suggérant une localisation vacuolaire ou au sein d'autres vésicules à pH acide.** Une forte augmentation de ces activités protéasiques a été spécifiquement observée lors d'une limitation en N chez Aviso et Ténor et associée à une dégradation des protéines solubles plus intense. **Sur la base de ces résultats, il est postulé qu'une limitation en N pourrait induire un trafic vésiculaire intensifié (notamment un transport des protéines chloroplastidiales vers la vacuole lytique centrale) chez ces génotypes par rapport à Samourai (Figure E-1).** En effet, cela pourrait expliquer la meilleure dégradation des protéines solubles chloroplastidiales telle que la RuBisCO par des protéases PLCPs à pH acide chez ces génotypes. Ce trafic vésiculaire accéléré ou intensifié pourrait être lié à des processus indépendants de l'autophagie telle que la formation de SAVs (Ishida *et al.*, 2014) présentant une forte activité CP telle que SAG12 (Otegui *et al.*, 2005 ; Martínez *et al.*, 2007 ; 2008a) ou encore des CCVs spécifiques de la dégradation des protéines chloroplastidiales (Wang et Blumwald, 2014) (Figure E-1). De plus, cette intensification du trafic vésiculaire pourrait être associée à une induction des processus d'autophagie connus pour être fortement impliqués dans la remobilisation du N chez *A. thaliana* (Avila-Ospina *et al.*, 2014) ou le maïs (Li *et al.*, 2015). En particulier, certains processus dépendants de l'autophagie pourraient intervenir tels que la formation de RCBs, identifiés au sein du cytoplasme de feuilles sénescents et qui sont également redirigés vers la vacuole centrale ou vers les SAVs (Chiba *et al.*, 2003 ; Martínez *et al.*, 2008a ; Prins *et al.*, 2008 ; Izumi *et al.*, 2010) (Figure E-1).

Par ailleurs, en plus du trafic vésiculaire permettant la mise en présence des protéines et des protéases, la compartimentation cellulaire joue un rôle régulateur très important durant la sénescence en amont de la PCD. Par exemple, les protéases de type RD21 sont synthétisées au sein du réticulum endoplasmique mais transitent dans le golgi en association avec des protéines PDI-thiorédoxine avant d'être véhiculés vers la vacuole lytique centrale (Ondzighi *et al.*, 2008 ; Cacas et Diamond, 2009 ; Cacas, 2010). L'association RD21-PDI permet de délivrer la protéase à la vacuole sans endommager les systèmes vésiculaires en régulant l'activité de la protéase.

Ainsi, la mise en place du trafic cellulaire mais également la chronologie de la maturation des différentes protéases et leur localisation dans les différents compartiments cellulaires correspondent à des mécanismes stratégiques de régulation de la sénescence (Havé *et al.*, 2016).

E.I.2 Mise en évidence des activités protéasiques impliquées dans la remobilisation du N lors de la sénescence des siliques

Afin d'améliorer l'ERA lors des stades reproducteurs, la compréhension des mécanismes protéolytiques à l'origine d'une remobilisation efficace des protéines provenant des péricarpes vers les graines correspond à une piste de recherche intéressante. En effet, la plus forte EUA chez certains géotypes de colza de printemps et d'hiver serait associée à une plus forte remobilisation du N des péricarpes (Balint et Rengel, 2011 ; Girondé *et al.*, 2015b). Ainsi, l'objectif de cette étude était d'identifier les protéases associées à la dégradation des protéines lors de la sénescence des enveloppes de siliques jusqu'à 10 semaines après floraison chez le géotype Aviso.

Comme attendu, il a été observé dans un premier temps que la diminution des teneurs en N et en protéines dans les péricarpes durant la sénescence était fortement corrélée à l'augmentation de teneurs en N et en protéines au sein des graines comme démontré par Girondé *et al.* (2015b). De plus, au sein des péricarpes, la diminution de la teneur en N est également fortement corrélée avec la diminution des protéines solubles telle que la RuBisCO.

Le niveau d'activités protéasiques et leurs identifications ont été réalisés grâce à la technique ABPP en se focalisant sur les protéases à sérine et cystéine qui sont les plus fortement impliquées dans la protéolyse durant la sénescence foliaire aux stades végétatifs (§ E.I.1). Nos résultats ont démontré que l'activité des **hydrolases à sérine** était augmentée durant la sénescence des siliques. De plus, 9 subtilisine (S8) et 7 carboxypeptidases dont une carboxypeptidase lysosomale (S10) ont été identifiées par LC MS/MS. De façon intéressante, deux subtilisines actives ont été identifiées dans des feuilles et des péricarpes sénescents chez Aviso (**Tableau E-3**). Par ailleurs, 1 subtilisine et 5 carboxypeptidases actives avaient également été identifiées lors de la sénescence foliaire en réponse à une limitation en N chez l'autre géotype Ténor (**Tableau E-3**).

L'activité des **PLCPs** augmente également dans les péricarpes durant la sénescence des siliques. Cette augmentation est fortement corrélée à la diminution de la teneur en N et en protéines solubles au sein des péricarpes. De plus, 3 RD21-like, 2 SAG12-like, 2 Aleurain-like (AALP) et 1 zingipain actives ont été identifiées lors de la sénescence des péricarpes (**Tableau E-3**). De façon intéressante, une RD21-like active a également été identifiée dans les feuilles chez Aviso (**Tableau E-3**). De plus, 3 RD21-like ainsi qu'1 SAG12-like, 1 AALP-like et 1 zingipain actives avaient également été identifiées lors de la sénescence foliaire en réponse à une limitation en N chez l'autre géotype Ténor.

En résumé, que ce soit pour les SPs ou les CPs, il apparait que certaines de ces protéases (subtilisines et carboxypeptidases pour les SPs, RD21-like, SAG12-like, AALP-like protéases pour les CPs) sont particulièrement actives à la fois (i) aux stades végétatifs lors de la remobilisation des protéines associées de la sénescence foliaire séquentielle et (ii) aux stades reproducteurs lors de la remobilisation des protéines associées à la sénescence des siliques (sénescence monocarpique). L'ensemble de ces données suggère donc que ces SPs et CPs spécifiques sont fortement impliquées dans l'optimisation de l'ERA tout au long du cycle de développement chez le colza. Elles constitueront donc des cibles à privilégier dans les perspectives de recherche qui seront mise en œuvre à court et moyen terme.

E.I.3 Perspectives à envisager afin d'améliorer l'ERA aux stades végétatifs et reproducteurs

Ces travaux de recherche doctorale ont permis de mettre en évidence une variabilité génotypique des activités protéasiques en réponse à une limitation en N aux stades végétatifs lors de la sénescence séquentielle. Par ailleurs, cette variabilité génotypique des processus de protéolyse semble être particulièrement corrélée à la variabilité génotypique de l'ERA observée par Girondé *et al.* (2015a). De plus, de nombreuses protéases particulièrement des CPs sont impliquées à la fois lors de la sénescence foliaire séquentielle mais également lors de la sénescence des péricarpes aux stades reproducteurs. Compte tenu de leur rôle prépondérant lors de la sénescence des siliques, elles pourraient également être impliquées dans les variabilités génotypiques observées lors du remplissage des graines chez le colza (Girondé *et al.*, 2015b).

Sur la base de ces travaux de thèse, plusieurs perspectives peuvent être envisagées dans le cadre du programme Investissement Avenir RAPSODYN afin de valider certains résultats mais également dans l'objectif plus général d'améliorer l'ERA et *in fine* l'EUA chez le colza.

En effet, à **court terme/ moyen terme**, il serait nécessaire d'approfondir certaines questions et de valider plusieurs observations obtenues lors de ces travaux :

(1) Dans le cadre de cette thèse, les protéases à aspartate n'ont été que peu étudiées tandis que les métalloprotéases n'ont pas été étudiées du fait de l'absence ou de l'indisponibilité de sondes activité-dépendante spécifiques de ces classes de protéases. Néanmoins, le rôle de ces classes de protéases a été démontré lors de la sénescence foliaire chez le colza et *A. thaliana* (Guo *et al.*, 2004 ; Buchnan-Wollaston *et al.*, 2005 ; Zelisko *et al.*, 2005 ; Desclos *et al.*, 2009 ; Chen *et al.*, 2011 ; Girondé *et al.*, 2016) mais aussi lors de la sénescence des siliques chez *A. thaliana*

(Wagstaff *et al.*, 2009). De ce fait, **le rôle des APs et MPs devrait également être étudié lors de ces deux types de sénescence et chez des génotypes à ERA contrastées.**

(2) Lors de cette étude, **il a été postulé qu'une limitation en N pourrait intensifier le trafic vésiculaire chez Ténor et Aviso par rapport au génotype Samouraï.** Pour vérifier cette hypothèse, **il sera nécessaire de caractériser les processus d'autophagie et de vérifier l'existence des SAVs ou d'autres vésicules chez le colza particulièrement en réponse à une limitation en N lors de la sénescence foliaire.** Plusieurs pistes de recherche pourraient être envisagées en collaboration avec l'équipe de Céline Masclaux-Daubresse (équipe SATURNE, IJPB, INRA Versailles). Des travaux de microscopie confocale et électronique à transmission, associés à des techniques d'immunodétection de PLCPs (RD21 et/ou SAG12) et de protéines de l'autophagie (e.g. ATG8) pourraient permettre de répondre à cette interrogation (Martínez *et al.*, 2008a). De plus, une co-localisation des SAVs et des activités PLCPs pourraient être envisagée en microscopie confocale. En effet, certains travaux ont consisté à marquer *in vivo* des cultures cellulaires d'*A. thaliana* avec les sondes fluorescentes activité-dépendante permettant ainsi de localiser l'activité du protéasome *in vivo* dans le noyau et le cytosol (Kolodziejek *et al.*, 2011). De tels travaux pourraient être envisagés avec la sonde MV201 (PLCPs-spécifique) au sein de cultures cellulaires de feuilles de colza.

(3) De plus, certaines protéases (RD21, SAG12, XBCP3 et des AALPs) ont été identifiées comme jouant un rôle prépondérant lors de la sénescence foliaire induite par une limitation en N aux stades végétatifs mais également lors de la sénescence des péricarpes. Ces protéases correspondent donc à des cibles préférentielles pour la sélection variétale de colza présentant de plus fortes capacités de remobilisation du N grâce à une plus forte capacité de dégradation des protéines solubles (i) en réponse à une limitation en N aux stades végétatifs mais également (ii) lors de la sénescence des péricarpes aux stades reproducteurs. Néanmoins, **une validation fonctionnelle préliminaire du rôle de ces protéases durant la sénescence constitue un prérequis indispensable.**

Par exemple, aux stades végétatifs, Ténor et Aviso présentent une très forte induction de l'activité de SAG12 lors de la sénescence sous contraintes azotées et cette activité n'a pas été retrouvée chez Samouraï. Ce résultat a été confirmé par l'absence de la protéase SAG12 chez Samouraï par western-blot et immunodétection. Néanmoins, l'étude de mutants *sag12* chez *A. thaliana* a montré que la sous-expression de ce gène aboutit à une croissance et une sénescence similaires à celles observées chez des plantes de type sauvage (Otegui *et al.*, 2005). Ces travaux ne remettent pas en cause les résultats obtenus car il serait nécessaire de réaliser une validation fonctionnelle de cette protéase en condition de limitation en N lorsque la protéase semble jouer

un rôle prépondérant chez le colza. De plus, il est possible que l'extinction du gène *SAG12* soit compensée par l'induction d'activités d'autres protéases cruciales lors de la sénescence telles que RD21, XBPC3 ou des AALPs. Une validation fonctionnelle du rôle de *SAG12* chez *A. thaliana* est actuellement réalisée dans le cadre du travail doctoral de Maxence James, adossé au programme Investissement d'Avenir RAPSODYN.

(4) Concernant le rôle des protéases lors de la sénescence des péricarpes, le recours à des techniques de **culture *in vitro* de siliques pourrait être très utile pour réaliser une validation fonctionnelle du rôle des PLCPs lors de la sénescence des péricarpes**. En effet, ces techniques permettraient de placer des siliques de différents géotypes de colza dans des conditions de cultures comparables et de leur appliquer divers traitements azotés. De plus, un marquage au ¹⁵N ainsi que l'ajout d'inhibiteurs de CPs dans le milieu de culture pourrait permettre d'appréhender les répercussions d'une inhibition des CPs sur le rendement ou la remobilisation du N vers les graines. Par ailleurs, l'ajout de sondes ABPP pourrait également permettre de réaliser un marquage des protéases *in vivo* afin de détecter les tissus dans lesquels elles agissent.

(5) Par ailleurs, **un screening des activités protéasiques (notamment des PLCPs) sur de nombreux géotypes de colza au stade rosette présentant des variabilités d'ERA et d'EUA en réponse à une limitation en N sera nécessaire**. Cette perspective pourrait être réalisée en conditions contrôlées ou de plein champ. De plus, cette étude permettrait en parallèle de **réaliser des screening des activités protéasiques (notamment des PLCPs) sur de nombreux géotypes de colza lors de la sénescence des péricarpes aux stades reproducteurs en réponse à une limitation en N**. En effet, plusieurs protéases associées à la remobilisation du N lors de la sénescence des siliques ont été identifiées mais leur rôle devra également être confirmé en cas de limitation en N.

Ces expérimentations nécessitent de suivre la progression de la sénescence et de la remobilisation du N des feuilles et des siliques afin de définir les stades les plus pertinents pour réaliser les prélèvements de matériel végétal puis les analyses des activités protéasiques. L'évolution de la sénescence et des processus de remobilisation (estimation de l'ERA foliaire) sera suivie *via* l'utilisation du système Multiplex® (méthodes spécifiquement mises au point dans le cadre du programme Rapsodyn). De plus, la technique ABPP, dont la mise en œuvre est relativement simple, pourrait permettre de réaliser un screening rapide (moyen débit) des activités protéasiques sur de nombreux géotypes cultivés sous contraintes azotées à différents stades de développement.

Par ailleurs, à **long terme** :

(6) Les protéases les plus spécifiquement impliquées dans une forte remobilisation du N lors de la sénescence foliaire aux stades végétatifs et de la sénescence des péricarpes peuvent être considérées comme des déterminants moléculaires d'une forte ERA en réponse à une limitation en N chez le colza. Ainsi, la perspective principale serait **d'utiliser ces protéases comme cibles lors de la sélection variétale de nouveaux géotypes de colza répondant de façon plus performante à la réduction des intrants azotés**. En effet, par le passé la sélection variétale des géotypes de plantes de grande culture a principalement été réalisée sous conditions de fort N et la culture des variétés actuelles sous contraintes azotée aboutit à une diminution importante du rendement. Ainsi, dans un contexte de limitation des intrants azotés, il semble indispensable de sélectionner des géotypes présentant de fortes capacités de remobilisation du N sous faible apports N.

Par ailleurs, la variation des quantités ou activités de ces protéases candidates peut permettre de définir des **PQLs (protein quantity loci)** (Damerval *et al.*, 1994) associés à des processus de remobilisation efficaces du N lors de la sénescence en réponse à une limitation azotée à différents stades de développement. De plus, De vienne *et al.* (1999) ont démontré que les protéines dont les PQLs sont co-localisés avec des QTL (Quantitative trait loci) d'intérêts sont des protéines candidates préférentielles. Le but serait donc de déterminer et de co-localiser des PQLs associés à la dégradation efficace des protéines lors de la sénescence avec des QTLs associés à des forts rendements ou une forte EUTa chez le colza déjà étudiés (Bouchet *et al.*, 2016).

E.II. Etude préliminaire de la régulation hormonale des protéases associées à la sénescence

De nombreuses voies hormonales sont impliquées dans la régulation positive ou négative de la sénescence foliaire (§B.III.3.c). Ainsi, il a été postulé que les différences génotypiques d'activités protéasiques observées lors de la sénescence foliaire entre Ténor et Samourai pouvaient être liées à une régulation phytohormonale différente. Afin de valider cette hypothèse, **l'objectif était de comparer les teneurs en phytohormones lors de la sénescence foliaire chez Ténor et Samourai en réponse à une limitation en N et de les corrélérer aux différences d'activités protéasiques observées.**

Il a été observé que la teneur en ABA est significativement augmentée au cours de la sénescence foliaire sous condition de faibles apports en N chez Ténor alors qu'elle a diminué chez Samouraï. De plus, la teneur en SA a également augmenté lors de la sénescence particulièrement en réponse à une limitation en N quel que soit le génotype considéré. Par ailleurs, les teneurs en l'isopentényladénine (IP) et isopentényladénosine (IPR), 2 molécules intermédiaires de la synthèse des CKs, ont diminué au cours de la sénescence, indépendamment du traitement N et du génotype.

De plus, les modifications du rapport entre les phytohormones capables d'accélérer la sénescence telles que l'ABA et le SA (Jibrán *et al.*, 2013), et les phytohormones régulant négativement les processus de sénescence telles que les CKs ont été analysés (Kant *et al.*, 2015 ; Zeng et Zhao, 2016). Le rapport (SA + ABA) / (IP + IPR) a fortement augmenté au cours de la sénescence foliaire chez Ténor particulièrement en réponse à une limitation en N. Par ailleurs, ce ratio est resté stable chez Samouraï quel que soit le traitement azoté.

L'augmentation de ce ratio chez Ténor a été clairement corrélée avec l'augmentation des activités des PLCPs et des SPs pendant la sénescence foliaire induite par une limitation azotée. Il a déjà été démontré que l'ABA et le SA sont capables de réguler la transcription ou l'abondance de protéases. En effet, un dysfonctionnement dans la synthèse de SA au cours de la sénescence conduit à une régulation négative de l'expression du gène *SAG12* chez *A. thaliana* (Morris *et al.*, 2000) tandis qu'une application exogène d'ABA aboutit à une augmentation de l'activité des protéases également associées aux processus de sénescence (Fukayama *et al.*, 2010).

En conclusion (**Figure E-1**) :

- Par rapport à Samouraï, lors de la sénescence foliaire aux stades végétatifs, **Ténor est caractérisé par un ratio phytohormonal (SA + ABA) / (IP + IPR) élevé et corrélé à une plus forte augmentation des activités protéasiques (PLCPs et SPs) sous contraintes azotées.**
- **Sur la base de ces résultats, il a été postulé que ces phytohormones pourraient être capables de réguler les activités des PLCPs et SPs lors de la sénescence foliaire chez le colza aux stades végétatifs.**

De plus, une étude préliminaire d'infiltration de SA ou d'eau dans des feuilles matures de colza (cv. Aviso) a été réalisée. La dégradation *in vitro* de la RuBisCO a été suivie en présence ou en l'absence de MG132 (inhibiteur du protéasome et des CPs). Lorsque les feuilles ont été infiltrées avec du SA, le niveau de dégradation de la RuBisCO a été fortement réduit en présence de MG132 (32% contre 60% en l'absence de MG132) par rapport à une infiltration avec de l'eau (46% contre 59% en l'absence de MG132). Cette inhibition accrue de la dégradation de la

RuBisCO par le MG132 après une infiltration de SA (46% contre 22% après une infiltration d'eau) suggère que la contribution des activités des CPs et du protéasome à la protéolyse est plus important après l'application de SA. Ces résultats renforcent l'hypothèse que le SA serait impliquée dans la régulation des activités des CPs et du protéasome. Une première étude d'infiltration de SA et ABA sur les cotylédons suivie de l'étude de l'activité des CPs et SPs par ABPP a permis de valider cette hypothèse (voir §E.III.3).

Par ailleurs, ces résultats restent à confirmer. En effet, l'étude de mutants ou transformants de colza insensibles à ces phytohormones ou incapable de synthétiser ces phytohormones pourrait permettre de valider l'effet de ces dernières sur la régulation de l'activité protéasique associée à la sénescence en réponse à une limitation en N. De plus, malgré l'étude de nombreuses phytohormones lors de cette thèse, l'éthylène n'a pas pu être dosé. L'**éthylène** (ET) correspond également à une phytohormone régulant positivement la sénescence dont la production est associée à l'initiation de la sénescence chez *A. thaliana* (Khan *et al.*, 2014). De plus, l'ET serait impliqué dans la régulation de facteurs de transcription de type NAC impliqués dans la régulation de *SAGs* (Khan *et al.*, 2014). De récents travaux ont démontré que la production d'éthylène était fortement augmentée lors d'une limitation en N chez *A. thaliana* et une variabilité naturelle de la production d'ET chez différentes accessions d'*A. thaliana* sous faibles apports azotés a été observée (De Gernier *et al.*, 2016). Lors de cette étude, il a été postulé que cette variabilité pourrait être exploitée dans le but d'améliorer l'EUA en manipulant le déclenchement et la durée de la sénescence sous limitation azotée (De Gernier *et al.*, 2016). De ce fait, une étude des variations de la production d'ET lors de la sénescence foliaire induite par une limitation en N pourrait être effectuée chez différents génotypes de colza en s'appuyant sur une nouvelle technique permettant une mesure précise de la production d'ET *via* un détecteur laser photo-acoustique (De Gernier *et al.*, 2016).

E.III. Peut-on utiliser la sénescence des cotylédons comme modèle d'étude de la sénescence foliaire chez le colza ?

La sénescence des cotylédons correspond au premier type de sénescence observé chez le colza et débute dès l'apparition des premières « feuilles vraies ».

L'objectif de cette étude sur les cotylédons était de **déterminer si la sénescence des cotylédons pouvait être utilisée comme modèle d'étude de la sénescence foliaire** mais également de déterminer si **ce modèle pouvait permettre d'étudier la variabilité génotypique de l'ERA à un stade très précoce**.

Tableau E-4: Synthèse des identifications protéasiques associées à la sénescence foliaire séquentielle et à la sénescence des cotylédons chez Ténor. Les protéases en vert correspondent aux protéases retrouvées lors des deux types de sénescence. Les protéases dont la case est colorée en bleu correspondent aux protéases actives chez Ténor mais absentes chez Samourai après une limitation en N de 23 jours. D: day; PLCP: papain-like cysteine protease; POPLs: prolyloligopeptidase-like protease; SCPLs: serine carboxypeptidase-like; AALP: aleurain-like protease; HN: high nitrate; LN: low nitrate.

Classe	Trait.	Ténor feuille sénescente		Trait.	Ténor cotylédon sénescant	
		Protein accession no [Brassica napus] / NCBI accession no.	Classe		Protein accession no [Brassica napus] / NCBI accession no.	Classe
Sérine protéases	D23 LN	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica napus] / gi 923682725	Subtilisins S8	D5 LN	PREDICTED: subtilisin-like protease SBT1.7 [Brassica napus] / gi 923682725	Subtilisins S8
		BnaCnng41800D [Brassica napus] / gi 674871280	Subtilisins S8			
		BnaA08g30180D [Brassica napus] / gi 674878293	POPLs S9			
		BnaC06g11680D [Brassica napus] / gi 674926851	POPLs S9			
		BnaCnng28400D [Brassica napus] / gi 674876980	POPLs S9			
		PREDICTED: acylamino-acid-releasing enzyme-like isoform X1 [Brassica napus] / gi 923687883	POPLs S9			
		PREDICTED: prolyl endopeptidase-like [Brassica napus] / gi 923689449	POPLs S9			
		BnaCnng64630D [Brassica napus] / gi 674859887	POPLs S9			
		PREDICTED: acylamino-acid-releasing enzyme-like [Brassica napus] / gi 923650996	POPLs S9			
		PREDICTED: prolyl endopeptidase-like [Brassica napus] / gi 923644108	POPLs S9			
		BnaA06g18620D [Brassica napus] / gi 674934323	SCPLs S10			
		PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 35 [Brassica napus] / gi 923844617	SCPLs S10			
		BnaA01g06330D [Brassica napus] / gi 674904822	SCPLs S10			
		PREDICTED: serine carboxypeptidase-like 29 [Brassica napus] / gi 923512696	SCPLs S10			
		BnaA08g12880D [Brassica napus] / gi 674909794	SCPLs S10			
		BnaA04g16130D [Brassica napus] / gi 674902461	SCPLs S10			
		BnaA10g23100D [Brassica napus] / gi 674963729	SCPLs S10			
		PREDICTED: lysosomal Pro-X carboxypeptidase-like [Brassica napus] / gi 923647110	SCPLs S10			
		BnaC01g38630D [Brassica napus] / gi 674875924	SCPLs S10			
		BnaA04g07190D [Brassica napus] / gi 674893092	SCPLs S10			
		PREDICTED: protease Do-like 1, chloroplastic [Brassica napus] / gi 923651657	Deg		PREDICTED: protease Do-like 1, chloroplastic [Brassica napus] / gi 923651657	Deg
PLCPs	D23 LN	Protein accession no [Brassica napus] / NCBI accession no.	Classe	D5 LN	Protein accession no [Brassica napus] / NCBI accession no.	Classe
		BnaA10g05390D [Brassica napus] / gi 674926680	RD21-like		BnaA10g05390D [Brassica napus] / gi 674926680	RD21-like
		BnaA08g04080D [Brassica napus] / gi 674916168	RD21-like		BnaA08g04080D [Brassica napus] / gi 674916168	RD21-like
		PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica napus] / gi 923896233	RD21-like		PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Brassica napus] / gi 923896233	RD21-like
		BnaA06g36920D [Brassica napus] / gi 674910774	RD21-like		BnaA06g36920D [Brassica napus] / gi 674910774	RD21-like
		senescence-specific cysteine protease [Brassica napus] / gi 5823018	SAG12-like		senescence-specific cysteine protease [Brassica napus] / gi 5823018	SAG12-like
		BnaA06g40240D [Brassica napus] / gi 674875014	SAG12-like			
		BnaA06g05780D [Brassica napus] / gi 674939790	XBCP3-like			
		PREDICTED: low-temperature-induced cysteine proteinase-like isoform X2 [Brassica napus] / gi 923828698	XBCP3-like			
		BnaC09g35690D [Brassica napus] / gi 674953141	AALP-like			
		PREDICTED: cysteine proteinase RD19a-like [Brassica napus] / gi 923844541	RD19-like			
		PREDICTED: cysteine proteinase RD19a [Brassica napus] / gi 923503374	RD19-like			
		BnaCnng01440D [Brassica napus] / gi 674926134	Cathepsin-B			
BnaA09g52180D [Brassica napus] / gi 674874900	Cathepsin-B					
BnaC01g26060D [Brassica napus] / gi 674965096	Zingipain					

E.III.1 Les modifications physiologiques et protéolytiques associées à la sénescence des cotylédons et à la sénescence foliaire sont similaires

Afin de déterminer si la sénescence des cotylédons pouvait être utilisée comme modèle de la sénescence foliaire, les modifications physiologiques et les activités protéasiques associées à la sénescence des cotylédons ont été étudiées chez Ténor et Samourai en présence ou en absence d'une limitation en nitrate pendant 5 jours (**Tableau E-1**).

En résumé, l'analyse des données physiologiques et des activités protéolytiques a montré que:

- pour un génotype considéré (Ténor ou Samourai), les modifications physiologiques associées à la sénescence (diminution des teneurs en chlorophylles et en protéines solubles) sont similaires à celles observées lors de la sénescence foliaire aux stades végétatifs. Ces observations sont en concordance avec les résultats de plusieurs études qui avaient observé une chute de la teneur en chlorophylles et en protéines lors de la sénescence des cotylédons chez le colza ([Ghosh et al., 2001](#) ; [Qin et al., 2006](#))
- l'activité des **protéases à sérine et à cystéine** augmente lors de la sénescence des cotylédons particulièrement lors d'une limitation en N.
- parmi les SPs et CPs actives qui ont été identifiées par LC MS/MS lors de la sénescence des cotylédons, plusieurs SPs et CPs ont également été caractérisées au cours de la sénescence foliaire séquentielle chez Ténor en réponse à une limitation en N.

Quel que soit le génotype considéré, les analyses menées grâce à la technique ABPP ont permis de mettre en évidence l'augmentation de l'activité des SPs et des CPs (PLCPs) lors de la sénescence des cotylédons particulièrement lors d'une limitation en N. Cette augmentation avait également été observée en réponse à une limitation en N lors de la sénescence foliaire séquentielle chez Ténor et Samourai.

De plus, 12 carboxypeptidases (S10), 1 subtilisine (S8) et 1 Deg-protéase actives ont été identifiées par LC MS/MS chez Ténor après 5 jours de limitation en nitrate. Parmi ces 14 SPs identifiées, il est intéressant de constater que 10 d'entre elles ont également été identifiées au cours de la sénescence foliaire séquentielle chez Ténor en réponse à une limitation en N (Tableau E-4). Pour les PLCPs, 4 protéases RD21-like et 1 protéase SAG12-like actives ont été identifiées chez Ténor après 5 jours de traitement LN. De façon intéressante, ces 5 protéases actives ont également été identifiées en réponse à une limitation en N lors de la sénescence foliaire séquentielle chez Ténor (Tableau E-4).

L'ensemble des points communs entre sénescence cotylédonnaire et foliaire, qui ont été mis en évidence lors de ces travaux de thèse, incite à penser que **la sénescence des cotylédons semble être un modèle prometteur pour étudier les modifications physiologiques et protéolytiques associées à la sénescence foliaire.**

E.III.2 Certaines protéases associées à une meilleure ERA chez Ténor lors de la sénescence foliaire sont déjà identifiées lors de la sénescence des cotylédons

Les travaux précédents aux stades végétatifs ont démontré que les variations génotypiques d'ERA lors de la sénescence foliaire étaient dépendantes de la capacité de protéolyse particulièrement lors d'une limitation en N. En effet lors de la sénescence induite par une limitation en N, le génotype Ténor, caractérisé par une forte ERA foliaire, présente une forte protéolyse qui semble dépendante de l'augmentation de l'activité des protéases à sérine mais aussi de l'augmentation et de l'induction de protéases à cystéine telles que des protéases RD21-like, RD19-like, SAG12-like, cathepsin-B, XBCP3-like and Aleurain-like par rapport au génotype Samourai.

Les résultats ont démontré que lors de la sénescence des cotylédons, les paramètres physiologiques associés à la sénescence tels que la diminution de la teneur en chlorophylles et en protéines solubles ne sont pas significativement différents entre les génotypes quel que soit le traitement azoté. En effet, la sénescence des cotylédons étant très rapide il est impossible de distinguer des variations phénotypiques entre les deux génotypes lors des 5 jours de sénescence des cotylédons. Ces résultats sont différents des résultats obtenus lors de la sénescence séquentielle aux stades végétatifs (§ E.I.1). En effet, lors de la sénescence séquentielle induite par une limitation en N, Ténor était caractérisé par une diminution de la quantité de chlorophylles de 82% contre seulement 51% pour le génotype Samourai (**Tableau E-1**) et une diminution de la teneur en protéines solubles de 85% contre seulement 70% chez Samourai.

De plus, l'activité spécifique des PLCPs et des SHs a augmenté pendant la sénescence des cotylédons particulièrement en cas de limitation azotée mais cette augmentation n'est pas significativement différente entre les génotypes. Ces résultats sont différents par rapport à la sénescence séquentielle aux stades végétatifs (§ E.I.1). En effet, lors de la sénescence foliaire induite par une limitation en N, Ténor était caractérisé par une plus forte activité des PLCPs et des SHs par rapport à Samourai (**Tableau E-1**).

Sur la base de ces résultats, il semblerait qu'il soit très difficile de distinguer les différences génotypiques d'activités protéasiques observées lors de la sénescence séquentielle dès la sénescence des cotylédons. Néanmoins, des résultats très prometteurs ont été obtenus particulièrement lors de l'étude de l'activité des PLCPs. En effet, bien que l'activité totale des

PLCPs ne soit pas quantitativement supérieure chez Ténor en comparaison à Samouraï lors de la sénescence des cotylédons, des différences qualitatives d'activité des PLCPs ont été observées. En effet, après 5 jours de limitation en N, le génotype Ténor a été caractérisé par l'apparition d'une forte activité protéasique à ~35 kDa totalement absente chez Samouraï. Ces protéases correspondent à 3 RD21-like dont deux ont également permis la distinction entre les génotypes Ténor et Samouraï lors de la sénescence séquentielle induite par une limitation en N et qui ont également été corrélées à la plus forte ERA de Ténor aux stades végétatifs (Tableau E-4).

Ces résultats sont très intéressants car ils démontrent que certaines différences génotypiques d'activités protéasiques observées lors de la sénescence foliaire séquentielle sont également retrouvées lors de la sénescence des cotylédons.

Bien que ces résultats restent à confirmer sur d'autres génotypes, ces deux protéases RD21-like correspondent donc à des « protéines cibles » pouvant permettre de réaliser un screening des activités protéasiques déterminantes pour l'ERA lors des stades végétatifs chez le colza dès les stades cotylédonaires, permettant ainsi un gain de temps considérable pour les sélectionneurs. En conclusion, le stade cotylédonaire pourrait être utilisé pour réaliser les screening des génotypes présentant de meilleures ERA au stade rosette, ce qui permettrait un gain de temps important lors des processus de sélection.

E.III.3 Exemple d'utilisation du cotylédon comme modèle expérimental pour étudier la sénescence foliaire : régulation phytohormonale des activités protéasiques

Afin de valider l'hypothèse que l'ABA et le SA seraient capables de réguler les activités protéasiques des SPs et PLCPs lors de la sénescence foliaire (§ E.I.1), une infiltration exogène de SA ou d'ABA a été réalisée sur des cotylédons matures de Ténor et les changements conséquents des activités protéasiques ont été observés 3 jours après infiltration en comparaison à une infiltration avec de l'eau.

Les résultats obtenus ont démontré que l'infiltration d'ABA induit une forte diminution de la teneur en chlorophylles et en protéines solubles par rapport à une infiltration avec de l'eau ou de l'acide salicylique 3 jours après l'infiltration. De plus, cette diminution de la teneur en protéines solubles est corrélée avec une diminution de l'abondance de la grande sous-unité de la RuBisCO. Par ailleurs, l'utilisation de la technique ABPP a montré que l'activité totale des PLCPs n'a pas augmenté quantitativement après une infiltration d'ABA mais l'activité de certaines PLCPs à ~35kDa a néanmoins été induite. Au contraire, l'infiltration d'ABA n'a eu aucun effet sur l'activité des hydrolases à serine (SHs).

De plus, il a été démontré qu'une **infiltration de SA** n'a pas de conséquence physiologique sur la teneur en chlorophylles ou en protéines solubles après 3 jours. Néanmoins, cette

infiltration a provoqué une augmentation de l'activité de certaines PLCPs à ~35 kDa mais également l'apparition d'une nouvelle activité très forte à ~30 kDa. Ces résultats pourraient être liés au fait que le SA agit comme un répresseur de l'expression des cystatines qui correspondent aux principaux inhibiteurs des protéases à cystéine (Doares *et al.*, 1995). De plus, l'infiltration de SA a provoqué une augmentation de l'activité totale des SHs particulièrement associée à l'induction de l'activité de SHs à ~70 kDa et ~ 40 kDa. L'induction d'un gène codant pour une SP a déjà été démontré après une application exogène de SA chez le sorgho (Salzman *et al.*, 2005).

L'ensemble des observations réalisées au cours de la sénescence cotylédonaire et foliaire suggère que (i) l'ABA peut réguler l'activité de certaines PLCPs et (ii) le SA semble capable de réguler l'activité des PLCPs et SHs. Néanmoins, la régulation de la sénescence des cotylédons pourrait être différente de celle qui a lieu lors de la sénescence foliaire séquentielle. Ainsi, il faudra valider les résultats obtenus au stade rosette et ne pas tirer de conclusions trop hâtives à partir des cotylédons.

E.III.4 Utilisation des cotylédons : les perspectives à envisager

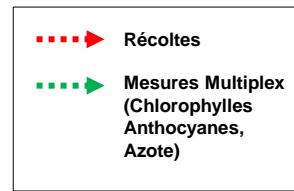
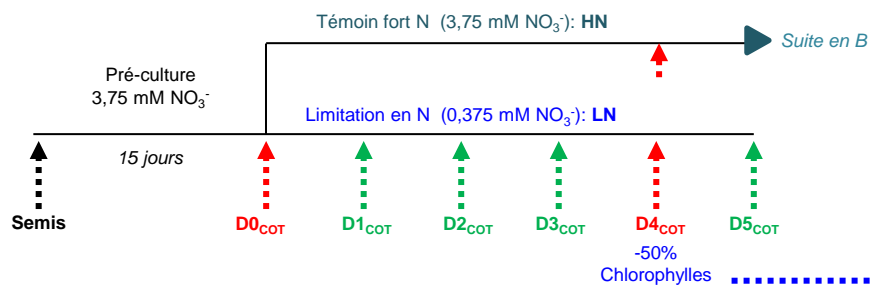
L'utilisation du modèle cotylédon pour réaliser des investigations sur la machinerie protéolytique lors de la sénescence a des avantages certains :

- (1) Premièrement, la sénescence des cotylédons est très rapide. En effet, lorsque le cotylédon de colza est mature, la sénescence se réalise en 5 jours. Cet aspect permet donc d'obtenir des résultats rapides sur les hypothèses postulées comparé à un stade de développement plus tardif.
- (2) De plus, le cotylédon correspond à un matériel végétal plus facile à manipuler. Par exemple, les infiltrations de phytohormones sont très difficiles à réaliser sur une feuille mature de colza du fait de leur rigidité et le risque d'endommager la feuille est, de ce fait, accentué. Le cotylédon a été en comparaison très facilement infiltré sans aucune altération de la « feuille ».

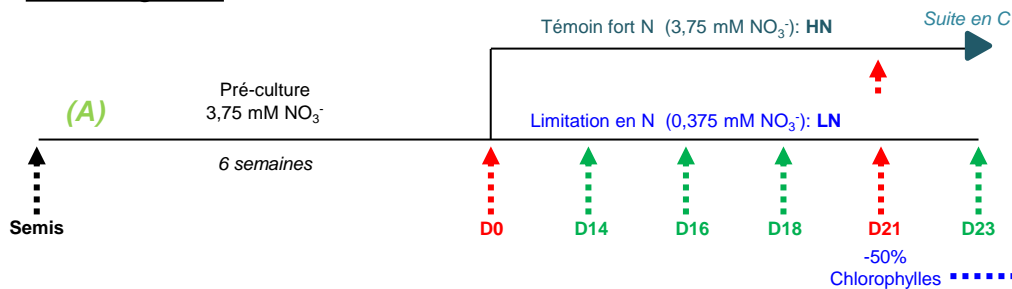
Le cotylédon semble donc être un modèle prometteur d'étude de la sénescence foliaire et grâce à ces travaux sur les cotylédons plusieurs perspectives peuvent être envisagées :

- (1) Premièrement, **le modèle cotylédon pourrait être utilisé afin d'étudier le trafic vésiculaire et ainsi valider l'hypothèse de l'implication de SAVs et/ou de l'autophagie lors de la sénescence chez le colza.** La présence d'autophagosomes et de corps autophagiques impliqués dans la dégradation des composants cellulaires a déjà été observée au sein de cotylédons de soja par microscopie électronique lors de la germination (Toyooka *et al.*, 2001). Ces données démontrent que l'implication de l'autophagie lors de la sénescence en

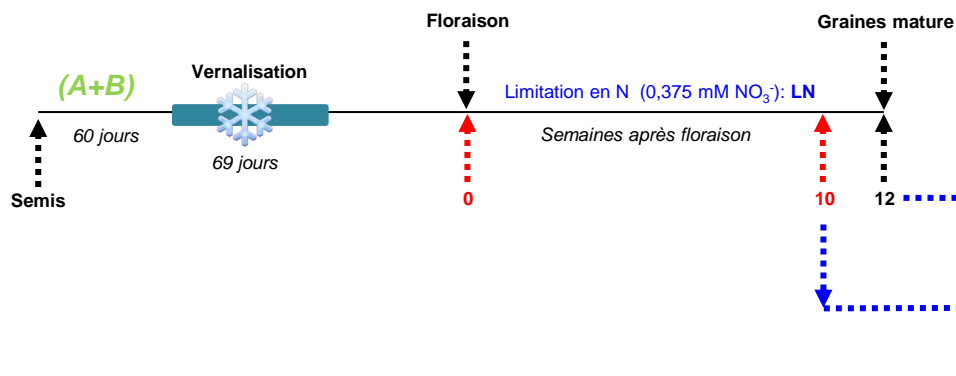
A. Stade cotylédonaire



B. Stades végétatifs



C. Stades reproducteurs



- (1) Comparaison de l'ERA des génotypes en réponse à une limitation en N aux stades B et C.
- (2) Relation activités protéasiques/ ERA en réponse à une limitation en N pour les stades B et C séparément.
- (3) Relation activités protéasiques/ ERA des différents stades avec les performances agronomiques finales (EUA).
- (4) Identifications de « protéases cibles » responsables d'une forte ERA lors des stades B et C et d'une forte EUA au stade C.
- (5) Comparaison de ces protéases avec celles des cotylédons afin de pouvoir identifier des cibles distinguant déjà les meilleurs génotypes dès le stade A.

Figure E-2: Dispositif expérimental permettant la comparaison des mécanismes protéolytiques associés à une meilleure ERA lors de la sénescence des cotylédons, lors de la sénescence foliaire séquentielle et lors de la sénescence des siliques chez différents génotypes de colza dans le but d'améliorer l'EUA sous contraintes azotées. Les flèches rouges correspondent aux dates de récoltes tandis que les flèches vertes correspondent aux dates pour lesquelles seules des mesures Multiplex® sont effectuées. Les récoltes lors des stades A et B seront réalisées lorsqu'une chute de 50% de la teneur en chlorophylles sera détectée. D'après ce protocole la limitation en N sera réalisée lors des trois stades et les plantes non limitées sont utilisées pour le stade suivant. ABPP: « Activity-binding protein profiling »; D: Day; HN: High nitrogen; LN: Low nitrogen.

réponse à une limitation en azote pourrait être rapidement étudiée au sein de cotylédons de colza.

(2) Deuxièmement, **un screening des activités protéasiques (notamment des PLCPs) sur de nombreux géotypes de colza présentant des variabilités d'ERA et d'EUA en réponse à une limitation en N au stade rosette pourrait être réalisé au stade rosette et en parallèle au stade cotylédons et lors de la sénescence des siliques.** En effet, si une activité protéasique semble associée à une meilleure ERA au stade rosette et lors de la sénescence des péricarpes chez certains géotypes, cette activité pourrait être également identifiée lors de la sénescence des cotylédons. Ainsi, cette protéase constituerait une excellente protéine cible pour sélectionner des géotypes de colza présentant des ERA optimisées tandis qu'un processus de sélection au stade cotylédon permettrait un gain de temps considérable.

Enfin, d'après les perspectives envisagées dans les chapitres §E.I.3 et §E.III.3, un protocole expérimental est proposé afin de pouvoir valider de nombreuses hypothèses aux stades cotylédonnaire, végétatifs et lors de la sénescence des siliques dans le but d'améliorer l'ERA et l'EUA chez le colza (**Figure E-2**).

Chapitre F: Références bibliographiques

Sites et images internet:

- www.arvalis-infos.fr
 - www.regletteazotecolza.fr
 - www.terresinovia.fr
 - www.terresunivia.fr
 - <http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/koehler/RAPS.jpg>
 - <http://www.agrisera.com/en/artiklar/sag12-sag12-protein.html>
 - <http://matrixscience.com>
-

A

Adam Z., Adamska I., Nakabayashi K., Ostersetzer O., Haussuhl K., Manuell A., Zheng B., Vallon O., Rodermeil S.R., Shinozaki K., Clarke A.K. (2001). Chloroplast and Mitochondrial Proteases in *Arabidopsis*. A Proposed Nomenclature. *Plant Physiology* 125, 1912-1918.

Adam Z., Rudella A., van Wijk K.J. (2006). Recent advances in the study of Clp, FtsH and other proteases located in chloroplasts. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 234-240.

Albertini A., Simeoni F., Galbiati M., Bauer H., Tonelli C., Cominelli E. (2014). Involvement of the vacuolar processing enzyme gamma VPE in response of *Arabidopsis thaliana* to water stress. *Biologia Plantarum* 58, 531-538.

Andersson A., Keskitalo J., Sjödin A., Bhalerao R., Sterky F., Wissel K., Tandré K., Aspeborg H., Moyle R., Ohmiya Y., Bhalerao R., Brunners A., Gustafsson P., Karlsson J., Lundeberg J., Nilsson O., Sandberg G., Strauss S., Sundberg B., Uhlen M., Jansson S., Nilsson P. (2004). A transcriptional timetable of autumn senescence. *Genome Biology* 5.

Antão C.M., Malcata F.X. (2005). Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiology and Biochemistry* 43, 637-650.

Aoyama S., Huaranca Reyes T., Guglielminetti L., Lu Y., Morita Y., Sato T., Yamaguchi J. (2014). Ubiquitin ligase ATL31 functions in leaf senescence in response to the balance between atmospheric CO₂ and nitrogen availability in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 55, 293-305.

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

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

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

B

Balibrea Lara M.E., Gonzales Garcia M.C., Fatima T., Ehneß R., Lee T.K., Proels R., Tanner W., Roitsch T. (2004). Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *Plant Cell* 16, 1276-1287.

Balint T., Rengel Z. (2008). Nitrogen efficiency of canola genotypes varies between vegetative stage and grain maturity. *Euphytica* 164, 421-432.

- Balint T., Rengel Z. (2011).** Nitrogen and sulfur uptake and remobilisation in canola genotypes with varied N- and S-use efficiency differ at vegetative and maturity stages. *Crop & Pasture Sciences* 62, 299-312.
- Bangerth K.F. (2015).** Basipetal auxin versus acropetal cytokinin transport, and their interaction with NO₃ fertilisation in cotyledon senescence and sink:source relationships in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Biology* 17, 1135-1145.
- Barrett A.J. (1994).** Classification of peptidases. *Methods Enzymology* 244, 1-15.
- Bayer R.G., Stael S., Csaszar E., Teige M. (2011).** Mining the soluble chloroplast proteome by affinity chromatography. *Proteomics* 11, 1287-1299.
- Beers E.P., Woffenden B.J., Zhap C. (2000).** Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. In: Lam E., Fukuda H., eds. *Programmed cell death in higher plants*. New York, USA: Springer.
- Beers E.P., Jones A.M., Dickerman A.W. (2004).** The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in *Arabidopsis*. *Phytochemistry* 65, 43-58.
- Behrens T., Horst W.L., Wiesler F. (2001).** Effect of rate, timing and form of nitrogen application on yield formation and nitrogen balance in oilseed rape production. *Plant nutrition - Food security and sustainability of agro-ecosystems*, 800-801.
- Bell G.E., Howell B.M., Johnson G.V., Raun W.R., Solie J.B., Stone M.L. (2004).** Optical sensing of turfgrass chlorophyll content and tissue nitrogen. *Hortscience* 39, 1130-1132.
- Bellow S. (2012).** Etude des composés phénoliques impliqués dans la réponse des feuilles de vigne au Mildiou. Thèse de Coctorat, Université de Paris Sud, France, 154p.
- Berry P.M., Spink J., Foulkes M.J., White P.J. (2010).** The physiological basis of genotypic differences in nitrogen use efficiency in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Field Crops Research* 119, 365-373.
- Bhalerao R., Keskitalo J., Erlandsson R., Björkbacka H., Birve S.J., Karlsson J., Gardeström P., Gustafsson P., Lundeberg J., Jansson S. (2003).** Gene expression in autumn leaves. *Plant Physiology* 131, 430-442.
- Billard V., Etienne P., Jannin L., Garnica M., Cruz F., Garcia-Mina J.M., Yvin J.C., Ourry A. (2014).** Two Biostimulants Derived from Algae or Humic Acid Induce Similar Responses in the Mineral Content and Gene Expression of Winter Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, DOI 10.1007/s00344-013-9372-2.
- Billen G., Garnier J., Lassaletta L. (2013).** The nitrogen cascade from agricultural soils to the sea: modelling nitrogen transfers at regional watershed and global scales. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368, DOI:10.1098/rstb.2013.0123.
- Biswal B., Mohapatra P.K., Biswal U.C., Raval M.K. (2012).** Leaf senescence and transformation of chloroplasts to gerontoplasts. In: Eaton-Rye JJ, Tripathy BC, Sharkey TD, eds. *Photosynthesis: plastid biology, energy conversion and carbon assimilation, advances in photosynthesis and respiration*, Vol. 34. Netherlands: Springer, 217-230.
- Blum H., Beier H., Gross H.J. (1987).** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gel. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- Bonneau L., Ge Y., Drury G.E., Gallois P. (2008).** FOCUS REVIEW PAPER : What happened to plant caspases? *Journal of Experimental Botany* 59, 491-499.
- Book A.J., Yang P., Scalf M., Smith L.M., Vierstra R.D. (2005).** Tripeptidyl Peptidase II. An Oligomeric Protease Complex from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 138, 1046-1057.

Bouchet A.S., Laperche A., Bissuel-Belaygue C., Snowdon R., Nesi N., Stahl A. (2016). Nitrogen use efficiency in rapeseed. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 36-38. DOI 10.1007/s13593-016-0371-0.

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

Braun H.P., Schmitz U.K. (1997). The Mitochondrial Processing Peptidase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29, 1043-1045.

Bray E.A., Bailey-Serres J., Weretilnyk E. (2000). Responses to abiotic stresses. In W. Gruissem, B. Buchanan, R. Jones, eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, 1158-1249.

Breeze E., Harrison E., McHattie S., Hughes L., Hickman R., Hill C., Kiddle S., Kim Y.S., Penfold C.A., Jenkins D., Zhang C., Morris K., Jenner C., Jackson S., Thomas B., Tabrett A., Legaie R., Moore J.D., Wild D.L., Ott S., Rand D., Beynon J., Denby K., Mead A., Buchanan-Wollaston V. (2011). High-resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *The Plant Cell* 23, 873-894.

Brown A.V., Hudson K.A. (2015). Developmental profiling of gene expression in soybean trifoliolate leaves and cotyledons. *BMC Plant Biology* 15, DOI: 10.1186/s12870-015-0553.

Brunel-Muguet S., Beauclair P., Bataillé M.P., Avice J.C., Trouverie J., Etienne P., Ourry A. (2013). Light restriction delays leaf senescence in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Plant Growth Regulation* 32, 506-518.

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

Buchanan-Wollaston V., Page T., Harrison E., Breeze E., Lim P.O., Nam H.G., Lin J.F., Wu S.H., Swidzinski J., Ishizaki K., Leaver C.J. (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 42, 567-585.

C

Cacas J.L., Diamond M. (2009). Is the autophagy machinery an executioner of programmed cell death in plants? *Trends in Plant Science* 14, 299-300.

Cacas J.L. (2010). Devil inside: does plant programmed cell death involve the endomembrane system? *Plant Cell and Environment* 33, 1453-1473.

Cai Y.M., Yu J., Gallois P. (2014). Endoplasmic reticulum stress-induced PCD and caspase-like activities involved. *Frontiers in Plant Science* 5, 41.

Cambra I., Hernandez D., Diaz I., Martinez M. (2012a). Structural basis for specificity of propeptide-enzyme interaction in barley C1A cysteine peptidase. *PLoS One* 7, e37234.

Cambra I., Martinez M., Dader B., Gonzalez-Melendi P., Gandullo J., Santamaria M.E., Diaz I. (2012b). A cathepsin F-like peptidase involved in barley grain protein mobilization, HvPap-1, is modulated by its own propeptide and by cystatins. *Journal of Experimental Botany* 63, 4615-4629.

Carré P., Pouzet A. (2014). Rapeseed market, worldwide and in Europe. *Oilseeds & fats Crops and Lipids* 21, 1-12.

- Carrión C.A., Costa M.L., Martínez D.E., Mohr C., Humbeck K., Guamet J.J. (2013).** *In vivo* inhibition of cysteine proteases provides evidence for the involvement of 'senescence-associated vacuoles' in chloroplast protein degradation during dark-induced senescence of tobacco leaves. *Journal of Experimental Botany* 64, 4967–4980.
- Carrión C.A., Martínez D.E., Costa M.L., Guamet J.J. (2014).** Senescence-associated vacuoles, a specific lytic compartment for degradation of chloroplastic proteins? *Plants* 3, 498-512.
- Carter C., Pan S., Zouhar J., Avila E.L., Girke T., Raikhel N.V. (2004).** The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *The Plant Cell* 16, 3285-3303.
- Castillo M., Leon J. (2008)** Expression of the beta-oxidation gene 3-ketoacyl-CoA thiolase 2 (KAT2) is required for the timely onset of natural and dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 59, 2171–2179.
- Chalker-Scott L. (1999).** Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology* 70, 1–9.
- Chandrasekar B., Colby T., Emran Khan Emon A., Jiang J., Hong T.N., Villamor J.G., Harzen A., Overkleeft H.S., van der Hoorn R.A.L. (2014).** Broad-range glycosidase activity profiling. *Molecular & Cellular Proteomics* 13, 2787-2800.
- Chauhan S., Srivalli S., Nautiyal A.R., Khanna-Chopra R. (2009).** Wheat cultivars differing in heat tolerance show a differential response to monocarpic senescence under high-temperature stress and the involvement of serine proteases. *Photosynthetica* 47, 536-547.
- Chaves M.M., Pereira J.S., Maroco J., Rodrigues M.L., Ricardo C.P.P., Osorio M.L., Carvalho I., Faria T., Pinheiro C. (2002).** How plants cope with water stress in the field. *Photosynthesis and growth. Annals of Botany* 89, 907–916.
- Chen H.J., Su C.T., Lin C.H., Huang G.J., Lin Y.H. (2010).** Expression of sweet potato cysteine protease SPCP2 altered developmental characteristics and stress responses in transgenic *Arabidopsis* plants. *Journal of Plant Physiology* 167, 838-847.
- Chen Z., Pang Q., Dai S., Wang Y., Chen S., Yan X. (2011).** Proteomic identification of differentially expressed proteins in *Arabidopsis* in response to methyl jasmonate. *Journal of Plant Physiology* 168, 995-1008.
- Chen H.J., Wu S.D., Huang G.J., Shen C.Y., Afiyanti M., Li W.J., Lin Y.H. (2012).** Expression of a cloned sweet potato catalase SPCAT1 alleviates ethephon-mediated leaf senescence and H₂O₂ elevation *Journal of Plant Physiology* 169, 86–97.
- Chen D., Wang S., Xiong B., Cao B., Deng X. (2015).** Carbon/Nitrogen Imbalance Associated with Drought-Induced Leaf Senescence in *Sorghum bicolor*. *PLoS ONE* 10, DOI:10.1371/journal.pone.0137026.
- Chen H.J., Huang Y.H., Huang G.J., Huang S.S., Chow T.J., Lin Y.H. (2015).** Sweet potato SPAP1 is a typical aspartic protease and participates in ethephon-mediated leaf senescence. *Journal of Plant Physiology* 180, 1-17.
- Chiba A., Ishida H., Nishizawa N.K., Makino A., Mae T. (2003).** Exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. *Plant Cell Physiology* 44, 914-921.
- Cho K., Masaba L., Fowler A.W., Walsh D.M., Park C.S. (2010).** Canola oil inhibits breast cancer cell growth in cultures and in vivo and acts synergistically with chemotherapeutic drugs. *Lipids* 45, 777-784.
- Chory J., Reinecke D., Sim S., Washburn T., Brenner M. (1994).** A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis* (*det* mutants have an altered response to cytokinins). *Annual Review of Plant Physiology* 104, 339–347.

Christ B., Hörtensteiner S. (2014). Mechanism and significance of chlorophyll breakdown. *Journal of Plant Growth Regulation* 33, 4-20.

Christiansen M.W., Gregersen P.L. (2014). Members of the barley NAC transcription factor gene family show differential co-regulation with senescence-associated genes during senescence of flag leaves. *Journal of Experimental Botany* 65, 4009-4022.

Clarke A.K. (2012). The chloroplast ATP-dependent Clp protease in vascular plants – new dimensions and future challenges. *Physiologia Plantarum* 145, 235-244.

Coffeen W.C., Wolpert T.J. (2004). Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *The Plant Cell* 16, 857-873.

Colnenne C., Meynard J.M., Reau R., Justes E., Merrien A. (1998). Determination of critical nitrogen curve for winter oilseed rape. *Annals of Botany* 81, 311-317.

Conant R.T., Berdanier A.B., Grace P.R. (2013). Patterns and trends in nitrogen use and nitrogen recovery efficiency in world agriculture. *Global Biogeochemical Cycles* 27, 558-566.

Cornah J.E., Smith S.M. (2002). Synthesis and function of glyoxylate cycle enzymes. In: Baker A, Graham IA, eds. *Plant Peroxisomes*: Kluwer Academic Publishers, 57-101.

Coupe S.A., Sinclair B.K., Watson L. M., Heyes J. A., Eason J.R. (2003). Identification of dehydration-responsive cysteine proteases during post-harvest senescence of broccoli florets. *Journal of Experimental Botany* 54, 1045-1056.

Craft-Brandner S.J., Hölzer R., Feller U. (1998). Influence of nitrogen deficiency on senescence and the amounts of RNA and proteins in wheat leaves. *Physiologia Plantarum* 102, 192-200.

D

D'Hooghe P. (2013). Impacts de la disponibilité en sulfate sur la physiologie de la feuille et sur la qualité, le métabolisme soufré et la germination de la graine de colza. Thèse de doctorat, Caen, 229p.

D'Hooghe P., Escamez S., Trouverie J., Avice J.C. (2013). Sulphur limitation provokes physiological and leaf proteome changes in oilseed rape that lead to perturbation of sulphur, carbon and oxidative metabolisms. *BMC Plant Biology* 7, 13-23.

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

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

Damerval C., Maurice A., Josse J.M., de Vienne D. (1994). Quantitative trait loci underlying gene product variation – a novel perspective for analysing regulation of genome expression. *Genetics* 137, 289-301.

Davies W.J., Zhang J., Yang J., Dodd I.C. (2011). Novel crop science to improve yield and resource use efficiency in water-limited agriculture. *Journal of Agricultural Science* 149, 123-131.

De Gernier H., DePessemier J., Xu J., Cristescu S.M., Van Der Straeten D., Verbruggen N., Hermans C. (2016). A Comparative Study of Ethylene Emanation upon Nitrogen Deficiency in Natural Accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* 7, DOI: 10.3389/fpls.2016.00070.

- De Vienne D., Leonardi A., Damerval C., Zivy M. (1999).** Genetics of proteome variation for QTL characterization: application to drought stress responses in maize. *Journal of Experimental Botany* 50, 303-309.
- Dejoux J.F., Recous S., Meynard J.M., Trinsoutrot I., Leterme P. (2000).** The fate of nitrogen from winter-frozen rapeseed leaves: mineralization, fluxes to the environment and uptake by rapeseed crop in spring. *Plant and Soil* 218, 257-272.
- Delannoy M., Alves G., Vertommen D., Ma J., Boutry M., Navarre C. (2008).** Identification of peptidases in *Nicotiana tabacum* leaf intracellular fluid. *Proteomics* 8, 2285-2298.
- Delorme V.G.R., McCabe P.F., Kim D.J., Leaver C.J. (2000).** A matrix metalloproteinase gene is expressed at the boundary of senescence and programmed cell death in cucumber. *Plant Physiology* 123, 917-927.
- Del Rio L.A., Sandalio L.M., Altomare D.A., Zilinskas B.A. (2003).** Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 54, 923-933.
- Demirevska-Kepova K., Hölzer R., Simova-Stoilova L., Feller U. (2005).** Heat stress effects on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco binding protein and Rubisco activase in wheat leaves. *Biologia Plantarum* 49, 521-525.
- Desclos M. (2008).** Modifications physiologiques et protéomique associées à la remobilisation de l'azote foliaire au cours de la sénescence séquentielle chez le colza (*Brassica napus* L.). Thèse de doctorat, Caen, 214p.
- Desclos M., Dubouset L., Etienne P., Le Caherec F., Satoh H., Bonnefoy J., Ourry A., Avice J.C. (2008).** A proteomic profiling approach to reveal a novel role of *Brassica napus* drought 22 kD/water-soluble chlorophyll-binding protein in young leaves during nitrogen remobilization induced by stressful conditions. *Plant Physiology* 147, 1830-1844.
- Desclos M., Etienne P., Coquet L., Jouenne T., Bonnefoy J., Segura R., Reze S., Ourry A., Avice J.C. (2009).** A combined ¹⁵N tracing/proteomics study in *Brassica napus* reveals the chronology of proteomics events associated with N remobilisation during leaf senescence induced by nitrate limitation or starvation. *Proteomics* 9, 3580-3608.
- Desclos-Théveniau M., Coquet L., Jouenne T., Etienne P. (2014).** Proteomic analysis of residual proteins in blades and petioles of fallen leaves of *Brassica napus*. *Plant Biology* 17, 408-418.
- Diaz C., Saliba-Colombani V., Loudet O., Belluomo P., Moreau L., Daniel-Vedele F., Morot-Gaudry J.F., Masclaux-Daubresse C. (2006).** Leaf yellowing and anthocyanin accumulation are two genetically independent strategies in response to nitrogen limitation in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology* 47, 74-83.
- Diaz C., Lemaître T., Christ A., Azzopardi M., Kato Y., Sato F., Morot-Gaudry J.F., Le Dily F., Masclaux-Daubresse C. (2008).** Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in *Arabidopsis* under low nitrogen nutrition. *Plant Physiology* 147, 1437-1449.
- Diaz I., Martinez M. (2013).** Plant C1A cysteine peptidases in germination and senescence. In: Rawlings N.D. and Salvesen G. (eds) *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier, Amsterdam, 1853-1858.
- Diaz-Mendoza M., Velasco-Arroyo B., Gonzalez-Melendi P., Martinez M., Diaz I. (2014).** C1A cysteine protease-cystatin interactions in leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 65, 3825-3833.
- Diaz-Mendoza M., Velasco-Arroyo B., Santamaria M.E., González-Melendi P., Martinez M., Diaz I. (2016).** Plant senescence and proteolysis: two processes with one destiny. *Genetics and Molecular Biology*, DOI: org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0015.
- Distelfeld A., Avni R., Fischer A.M. (2014).** Senescence, nutrient remobilization, and yield in wheat and barley. *Journal of Experimental Botany* 65, 3783-3798.

Doares S.H., Narvaez-Vasquez J., Conconi A., Ryan C.A. (1995). Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiology* 108, 1741-1746.

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

Dreccer M.F., Schapendonk A.H.C.M., Slafer G.A., 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 yield. *Plant and Soil* 220, 189-205.

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

E

Eason J.R., Ryan D.J., Watson L.M., Hedderley D., Christey M.C., Braun R.H., Coupe S.A. (2005). Suppression of the cysteine protease, aleurain, delays floret senescence in *Brassica oleracea*. *Plant Molecular Biology* 57, 645-657.

Eason J.R., West P.J., Brummell D.A., Watson L.M., Somerfield S.D., McLachlan A.R.G. (2014). Overexpression of the protease inhibitor BoCPI-1 in broccoli delays chlorophyll loss after harvest and causes down-regulation of cysteine protease gene expression. *Postharvest Biology and Technology* 97, 23-31.

Ellis C.M., Nagpal P., Young J.C., Hagen G., Guilfoyle T.J., Reed J.W. (2005). AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 132, 4563-74.

Enami H.R. (2011). A review of using canola/rapeseed meal in aquaculture feeding. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 6, 22-36.

Epstein E., Bloom A.J. (2005). *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives*. 2nd edn (Sunderland, MA, USA: Sinauer).

Espinoza C., Medina C., Somerville S., Arce-Johnson P. (2007). Senescence-associated genes induced during compatible viral interactions with grapevine and *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 58, 3197-3212.

Esteban-García B., Garrido-Cardenas J.A., Alonso D.L., García-Maroto F. (2010). A distinct subfamily of papain-like cysteine proteinases regulated by senescence and stresses in *Glycine max*. *Journal of Plant Physiology* 167, 1101-1108.

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

F

Fagard M., Launay A., Clement G., Courtial J., Dellagi A., Farjad M., Krapp A., Soulie M.C., Masclaux-Daubresse C. (2014). Nitrogen metabolism meets phytopathology. *Journal of Experimental Botany* 65, 5643-5656.

Feller U., Fischer A. (1994). Nitrogen metabolism in senescing leaves. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13, 241-273.

Feller U., Anders I., Mae T. (2008). Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *Journal of Experimental Botany* 59, 1615-1624.

Fernandez-Calvino L., Guzman-Benito I., Toro F.J., Donaire L., Castro-Sanz A.B., Ruiz-Ferrer V., Llave C. (2015). Activation of senescence-associated Dark-inducible (DIN) genes during infection contributes to enhanced susceptibility to plant viruses. *Molecular Plant Pathology* 17, 3-15.

Fismes J., Vong P.C., Guckert A., Frossard E. (2000). Influence of sulfur on apparent N-use efficiency, yield and quality of oilseed rape (*Brassica napus* L.) grown on a calcareous soil. *European Journal of Agronomy* 12, 127-141.

Flinn B.S. (2008). Plant extracellular matrix metalloproteinases. *Functional Plant Biology* 35, 1183-1193.

Foster R., Williamson C.S., Lunn J. (2009). BRIEFING PAPER: Culinary oils and their health effects. *Nutrition Bulletin* 34, 4-47.

Fuentes S.I., Allen D.J., Ortiz-Lopez A., Hernández G. (2001). Over-expression of cytosolic glutamine synthetase increases photosynthesis and growth at low nitrogen concentrations. *Journal of Experimental Botany* 52, 1071-1081.

Fujiki Y., Yoshikawa Y., Sato T., Inada N., Ito M., Nishida I., Watanabe A. (2001). Dark-inducible genes from *Arabidopsis thaliana* are associated with leaf senescence and repressed by sugars. *Physiol Plant* 111, 345-352.

Fukayama H., Abe R., Uchida N. (2010). SDS-dependent proteases induced by ABA and its relation to Rubisco and Rubisco activase contents in rice leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 808-812.

Furbank R.T., White R., Palta J.A., Turner N.C. (2004). Internal recycling of respiratory CO₂ in pods of chickpea (*Cicer arietinum* L.): the role of pod wall, seed coat, and embryo. *Journal of Experimental Botany* 55, 1687-1696.

G

Gakh O., Cavadini P., Isaya G. (2002). Mitochondrial processing peptidases. *Biochimica and Biophysica Acta* 1592, 63-77.

Gallois P., Rotari V., He R., Ge Y. (2007). Identification of caspase-like proteases regulating programmed cell death in *Arabidopsis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular and Integrative Physiology* 146, S201-S202.

Gan S. (2007). Senescence processes in plants. Blackwell, London.

Gan S., Amasino R.M. (1995). Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270, 1986-1988.

Gan S., Amasino R.M. (1997). Making sense of senescence. *Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. Plant Physiology* 113, 313-319.

Garcia-Lorenzo M., Sjödin A., Jansson S., Funk C. (2006). Protease gene families in *Populus* and *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* 6, 30.

Gaufichon L., Masclaux-Daubresse C., Tcherkez G., Reisdorf-Cren M., Sakakibara Y., Hase T., Clément G., Avicé J.C., Grandjean O., Marmagne A., Boutet-Mercey S., Azzopardi M., Soulay F., Suzuki A. (2013). *Arabidopsis thaliana* ASN2 encoding asparagine synthetase is involved in the control of nitrogen assimilation and export during vegetative growth. *Plant Cell and Environment* 36, 328-342.

Ge Y., Cai Y.M., Rotari V., Danon A., McKenzie E.A., McLellan H., Mach L., Gallois P. (2016). Inhibition of cathepsin B by caspase-3 inhibitors blocks programmed cell death in *Arabidopsis*. *Cell Death and Differentiation* 23, 1493-1501.

Gehringer A., Snowdon R., Spiller T., Basunanda P., Friedt W. (2007). New oilseed rape (*Brassica napus*) hybrids with levels of heterosis for seed yield under nutrient-poor conditions. *Breeding Science* 57, 315-320.

Ghosh S., Mahoney S.R., Penterman J.N., Peirson D., Dumbroff E.B. (2001). Ultrastructural and biochemical changes in chloroplasts during *Brassica napus* senescence. *Plant Physiology and Biochemistry* 39, 777-784.

Girondé A. (2015). Exploration de la variabilité génotypique de l'efficacité d'usage du N chez le colza d'hiver : vers un idéotype adapté à une limitation en nitrate et l'identification des mécanismes protéolytiques impliqués dans une remobilisation foliaire efficace. Thèse de doctorat, Caen, 185p.

Girondé A., Poret M., Etienne P., Trouverie J., Bouchereau A., Le Cahérec F., Leport L., Orsel M., Niogret M.F., Deleu C., Avice J.C. (2015a). A profiling approach of the natural variability of foliar N remobilization at the rosette stage gives clues to understand the limiting processes involved in the low N use efficiency of winter oilseed rape. *Journal of Experimental Botany* 66, 2461-2473.

Girondé A., Etienne P., Trouverie J., Bouchereau A., Le Cahérec F., Leport L., Orsel M., Niogret M.F., Nesi N., Deleu C., Soulay F., Masclaux-Daubresse C., Avice J.C. (2015b). The contrasting management of two oilseed rape genotypes reveals the mechanisms of proteolysis associated with leaf N remobilization and the respective contributions of leaves and stems to N storage and remobilization during seed filling. *BMC Plant Biology* 21, 15-59.

Girondé A., Poret M., Etienne P., Trouverie J., Bouchereau A., Le Cahérec F., Leport L., Niogret M.F., Avice J.C. (2016). A comparative study of proteolytic mechanisms during leaf senescence of four genotypes of winter oilseed rape highlighted relevant physiological and molecular traits for NRE improvement. *Plants* 5. DOI: 10.3390/plants5010001.

Glass AD. (2003). Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraint upon nitrogen absorption. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22, 453-470.

Golczyk H., Greiner S., Wanner G., Weihe A., Bock R., Börner T., Herrmann R.G. (2014). Chloroplast DNA in Mature and Senescing Leaves: A Reappraisal. *The Plant Cell* 26, 847-854.

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

Golldack D., Vera P., Dietz K.J. (2003). Expression of subtilisin-like serine proteases in *Arabidopsis thaliana* is cell-specific and responds to jasmonic acid and heavy metals with developmental differences. *Physiologia Plantarum* 118, 64-73.

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

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

Gong Y.H., Zhang J., Gao J.F., Lu J.Y., Wang J.R. (2005). Slow export of photoassimilate from stay-green leaves during late grain-filling stage in hybrid winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science* 191, 292-299.

- Good A.G., Shrawat A.K., Muench D.G. (2004).** Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends In Plant Science* 9, 597-605.
- Good A.G., Johnson S.J., Pauw M.D., Carroll R.T., Savidov N., Vidmar J., Lu Z., Taylor G., Stroehrer V. (2007).** Engineering nitrogen use efficiency with alanine aminotransferase. *Canadian Journal of Botany* 85, 252-262.
- Good A.G., Beatty P.H. (2011).** Biotechnological approaches to improving nitrogen use efficiency in plants: alanine aminotransferase as a case study. In: Hawkesford MJ, Barraclough P, eds. *The molecular and physiological basis of nutrient use efficiency in crops*. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Inc., 5-19.
- Graham J.S., Xiong J., Gillikin J.W. (1991).** Purification and developmental analysis of a metalloendoproteinase from the leaves of *Glycine max*. *Plant Physiology* 97, 786-792.
- Grbic V., Bleecker A.B. (1995).** Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 8, 595-602.
- Grbic V. (2003).** SAG and SAG12 protein expression in senescing *Arabidopsis* plants. *Physiologia Plantarum* 119, 263-269.
- Gregersen P.L., Holm P.B. (2007).** Transcriptome analysis of senescence in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnology Journal* 5, 192-206.
- Gregersen P.L., Holm P.B., Krupinska K. (2008).** Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. *Plant Biology* 10, 37-49.
- Gregersen P.L. (2011).** Senescence and nutrient remobilization in crop plants. In: Hawkesford MJ, Barraclough P, eds. *The Molecular and Physiological basis of nutrient use efficiency in crop*: John Wiley & Sons Inc, 83-102.
- Gregersen P.L., Cutelic A., Boschian L., Krupinska K. (2013).** Plant senescence and crop productivity. *Plant Molecular Biology* 82, 603-622.
- Gu C., Kolodziejek I., Misas-Villamil J.C., Shindo T., Colby T., Verdoes M., Richau K.H., Schmidt J., Overkleeft H., van der Hoorn R.A.L. (2010).** Proteasome activity profiling: a simple, robust and versatile method revealing subunit-selective inhibitors and cytoplasmic, defence-induced proteasome activities. *The Plant Journal* 62, 160-170.
- Gu C., Shabab M., Strasser R., Wolters P.J., Shindo T., Niemer M., Kaschani F., Mach L., van der Hoorn R.A.L. (2012).** Post-translational regulation and trafficking of the granulin-containing protease RD21 of *Arabidopsis thaliana*. *PLOS One* 7, e32422.
- Guiboileau A., Sormani R., Meyer C., Masclaux-Daubresse C. (2010).** Senescence and death of plant organs: nutrient recycling and developmental regulation. *Comptes Rendus Biologies* 333, 382-391.
- Guo Y., Cai Z., Gan S. (2004).** Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant, Cell and Environment* 27, 521-549.
- Guo Y., Gan S.S. (2005).** Leaf senescence: signals, execution, and regulation. *Current Topic in Developmental Biology* 71, 83-112.
- Guo Y., Gan S.S. (2012).** Convergence and divergence in gene expression profiles induced by leaf senescence and 27 senescence-promoting hormonal, pathological and environmental stress treatments. *Plant Cell Environment* 35, 644-55.
- Guo Y., Gan S.S. (2014).** Translational researches on leaf senescence for enhancing plant productivity and quality. *Journal of Experimental Botany* 65, 3901-3913.

H

- Han M., Okamoto M., Beatty P.H., Rothstein S.J., Good A.G. (2015).** The genetics of nitrogen use efficiency in crop plants. *Annual Review of Genetics* 13, DOI:10.1146/annurev-genet-112414-055037.
- Hara-Nishimura I., Hatsugai N., Nakaune S., Kuroyanagi M., Nishimura M. (2005).** Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 404–408.
- Hara-Nishimura I., Hatsugai N. (2011).** The role of vacuole in plant cell death. *Cell death and Differentiation* 18, 1298-1304.
- Hatsugai N., Kuroyanagi M., Yamada K., Meshi T., Tsuda S., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. (2004).** A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* 305, 855–858.
- Hatsugai N., Yamada K., Goto-Yamada S., Nara-Nishimura I. (2015).** Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death. *Frontiers in Plant Science* 6, 234.
- Havé M., Marmagne A., Chardon F., Masclaux-Daubresse C. (2016).** Nitrogen remobilisation during leaf senescence: lessons from *Arabidopsis* to crops. *Journal of Experimental Botany*, DOI: 10.1093/jxb/erw365.
- Hayashi M., Toriyama K., Kondo M., Kato A., Mano S., De Bellis L., Hayashi-Ishimaru Y., Yamaguchi K., Hayashi H., Nishimura M. (2000).** Functional transformation of plant peroxisomes. *Cell Biochemistry and Biophysics* 32, 295-304.
- He Y., Tang W., Swain J.D., Green A.L., Jack T.P., Gan S. (2001).** Networking senescence-regulating pathways by using *Arabidopsis* enhancer trap lines. *Plant Physiology* 126, 707–716.
- He Y.H., Fukushige H., Hildebrand D.F., Gan S.S. (2002).** Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Physiology* 128, 876–884.
- He P., Osaki M., Takebe M., Shinano T., Wasaki J. (2005).** Endogenous hormones and expression of senescence-related genes in different senescent types of maize. *Journal of Experimental Botany* 56, 1117–1128.
- Hebinger H. (2013).** Le colza. France Agricole. FA.ENV.AGRICOLE. 527 pages. ISBN-10: 285557241X.
- Hensel L.L., Grbic V., Baumgarten D.A., Bleecker A.B. (1993).** Developmental and age related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 5, 553-564.
- Herrera-Rodriguez M.B., Perez-vincente R., Maldonado J.M. (2007).** Expression of asparagine synthetase genes in sunflower (*Helianthus annuus*) under various environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* 45, 33-38.
- Himelblau E., Amasino R.M. (2001).** Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *Journal of Plant Physiology* 158, 1317–1323.
- Hinderhofer K., Zentgraf U. (2001).** Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. *Planta* 213, 469-473.
- Hoch W.A., Singaas E.L., McCown B.H. (2003).** Resorption protection. Anthocyanins facilitate nutrient recovery in autumn by shielding leaves from potentially damaging light levels. *Plant Physiology* 133, 1296-1305.
- Hocking P.J., Mason L. (1993).** Accumulation, distribution and redistribution of dry matter and mineral nutrients in fruits of canola (oilseed rape), and the effects of nitrogen fertilizer and windrowing. *Australian Journal of Agricultural Research*. 44, 1377–1388.
- Horák J., Grefen C., Berendzen K.W., Hahn A., Stierhof Y.D., Stadelhofer B., Stahl M., Koncz C., Harter K. (2008).** The *Arabidopsis thaliana* response regulator ARR22 is a putative AHP phospho-histidine

phosphatase expressed in the chalaza of developing seeds. *BMC Plant Biology* 8, DOI: 10.1186/1471-2229-8-77.

Horigome D., Satoh H., Itoh N., Mitsunaga K., Oonishi I., Nakagawa A., Uchida A. (2007). Structural Mechanism and Photoprotective Function of Water-soluble Chlorophyll-binding Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 6525–6531.

Hörtensteiner S., Feller U. (2002). Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Botany* 53, 927-937.

Hou K., Wu W., Gan S.S. (2013). SAUR36, a small auxin up RNA gene, is involved in the promotion of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 161, 1002–1009.

Hung S., Umemura T., Yamashiro S., Slinger S. (1977). The effects of original and randomized rapeseed oils containing high or very low levels of erucic acid on cardiac lipids and myocardial lesions in rats. *Lipids* 12, 215-221.

Hunkova E., Zivcak M., Olsovska K. (2011). Leaf area duration of oilseed rape (*Brassica napus* subsp. *napus*) varieties and hybrids and its relationship to selected growth and productivity parameters. *Journal of Central European Agriculture* 12, 1–15.

I

Ilami G., Nespoulous C., Huet J.C., Vartanian N., Pernollet J.C. (1997). Characterization of BnD22, a drought-induced protein expressed in *Brassica napus* leaves. *Phytochemistry* 45, 1-8.

Ishida H., Yoshimoto K., Izumi M., Reisen D., Yano Y., Makino A., Ohsumi Y., Hanson M.R., Mae T. (2008). Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiology* 148, 142-155.

Ishida H., Izumi M., Wada S., Makino A. (2014). Roles of autophagy in chloroplast recycling. *Biochimica and Biophysica Acta* 1837, 512-521.

Izumi M., Wada S., Makino A., Ishida H. (2010). The autophagic degradation of chloroplasts *via* rubisco-containing bodies is specifically linked to leaf carbon status but not nitrogen status in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 154, 1196-1209.

J

Jajic I., Sarna T., Strzalka K. (2015). Senescence, Stress, and Reactive Oxygen Species. *Plants* 4, 393-411.

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

Jibrán R., Hunter D.A., Dijkwel P.P. (2013). Hormonal regulation of leaf senescence through integration of developmental and stress signals. *Plant Molecular Biology* 82, 547-561.

Jing H.C., Schippers J.H., Hille J., Dijkwel P.P. (2005). Ethylene-induced leaf senescence depends on age-related changes and OLD genes in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 56, 2915–2923.

Jing C.H., Nam H.G. (2012). Leaf senescence in plants: from model plants to crops, still so many unknowns. *Journal of Integrative Plant Biology* 54, 514-515.

Jordi W., Schapendonk A., Davelaar E., Stoopen G.M., Pot C.S., De Visser R., Van Rhijn J.A., Gan S., Amasino R.M. (2000). Increased cytokinin levels in transgenic P-SAG12-IPT tobacco plants have large

direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. *Plant Cell Environment* 23, 279–289.

Jubany-Mari T., Munne-Bosch S., Lopez-Carbonell, M., Alegre L. (2009). Hydrogen peroxide is involved in the acclimation of the mediterranean shrub, *cistus albidus* L., to summer drought. *Journal of Experimental Botany* 60, 107–120.

Jukanti A.K., Heidlebaugh N.M., Parrott D.L., Fischer I.A., McInnerney K., Fischer A.M. (2008). Comparative transcriptome profiling of near-isogenic barley (*Hordeum vulgare*) lines differing in the allelic state of a major grain protein content locus identifies genes with possible roles in leaf senescence and nitrogen reallocation. *New Phytologist* 177, 333-349.

Jukanti A.K., Fischer A.M. (2008). A high-grain protein content locus on barley (*Hordeum vulgare*) chromosome 6 is associated with increased flag leaf proteolysis and nitrogen remobilization. *Physiologia Plantarum* 132, 426–439.

Jullien A. (2010). Présentation intitulée « Modélisation des interactions entre morphogénèse et relations sources-puits chez le colza cultivé au champ au moyen solveur GreenLab », UMR 1091, INRA/AgroParisTech EGC Grignon, équipe EGC plante, réseau IGEC, 9 mars 2010, Montpellier.

Jung C., Lyou S.H., Yeu S., Kim M.A., Rhee S., Kim M., Lee J.S., Choi Y.D., Cheong J.J. (2007). Microarray-based screening of jasmonate responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Report* 26, 1053–1063.

Jusko A.K., Kosciak B. (2002). Possible use of the chlorophyll meter (SPAD-502) for evaluating nitrogen nutrition of the Virginia tobacco. *Electronic Journal of Polish Agricultural universities* 5.

K

Kant S., Burch D., Badenhorst P., Palanisamy R., Mason J., Spangenberg G. (2015). Regulated Expression of a Cytokinin Biosynthesis Gene IPT Delays Leaf Senescence and Improves Yield under Rainfed and Irrigated Conditions in Canola (*Brassica napus* L.). *PLoS ONE* 10, DOI:10.1371/journal.pone.0116349.

Kaschani F., Gu C., Niessen S., Hoover H., Cravatt B.F., van der Hoorn R.A.L. (2009). Diversity of serine hydrolase activities of unchallenged and botrytis-infected *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & Cellular Proteomics* 8, 1082-1093.

Kaschani F., Nickel S., Pandey B., Cravatt B.F., Kaiser M., van der Hoorn R.A.L. (2011). Selective inhibition of plant serine hydrolases by agrochemicals revealed by competitive ABPP. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20, 597–600.

Kaschani F., Gu C., van der Hoorn R.A.L. (2012). Activity-based protein profiling of infected plants. *Methods in Molecular Biology* 835, 47-59.

Kato Y., Murakami S., Nakano T., Sato F. (2001). CND41, a chloroplast DNA-binding protease, is involved in Rubisco degradation. *Science Access* 3, 1-4.

Kato Y., Murakami S., Yamamoto Y., Chatani H., Kondo Y., Nakano T., Yokota A., Sato F. (2004). The DNA-binding protease, CND41, and the degradation of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase in senescent leaves of tobacco. *Planta* 220, 97-104.

Kato Y., Yamamoto Y., Murakami S., Sato F. (2005). Post-translational regulation of CND41 protease activity in senescent tobacco leaves. *Planta* 222, 643-651.

Kato Y., Sakamoto W. (2009). Protein quality control in chloroplasts: A current model of D1 protein degradation in the photosystem II repair cycle. *Journal of Biochemistry* 146, 463-469.

- Kato Y., Sakamoto W. (2010).** New insights into the types and function of proteases in plastids. In: Jeon KW, ed. International review of cell and molecular biology, Vol. 280: Elsevier Inc., 185-218.
- Kato Y., Ozawa S.I., Takahashi Y., Sakamoto W. (2015).** D1 fragmentation in photosystem II repair caused by photo-damage of a two-step model. *Photosynthesis Research* 126, 409–416.
- Keech O., Pesquet E., Ahad A., Askne A., Nordvall D., Vodnala S.M., Tuominen H., Hurry V., Dizengremel P., Gardeström P. (2007).** The different fates of mitochondria and chloroplasts during dark-induced senescence in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell Environment* 30, 1523-1534.
- Kempema L.A., Cui X., Holzer F.M., Walling L.L. (2015).** *Arabidopsis* transcriptome changes in response to phloem feeding silver leaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids. *Plant Physiology* 143, 849-865.
- Kessel B., Schierholt A., Becker H.C. (2012).** Nitrogen use efficiency in a genetically diverse set of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Crop Science* 52, 2546-2554.
- Khan M., Rozhon W., Poppenberger B. (2014).** The role of hormones in the aging of plants – A mini-review. *Gerontology* 60, 49-55.
- Khanna-chopra R. (2012).** Leaf senescence and abiotic stresses share reactive oxygen species-mediated chloroplast degradation. *Protoplasma* 249, 469–481.
- Kidric M., Kos J., Sabotic J. (2014a).** Protease and their endogenous inhibitors in the plant response to abiotic stress. *Botanica Serbica* 38, 139-158.
- Kim, D.J. (2004).** Study of Cotyledon Senescence in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Based on Expressed Sequence Tags and Gene Expression. *Journal of Plant Biology* 47, 244-253.
- Kim D.J. (2011).** A Study of Cotyledon Senescence in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Based on Expressed Sequence Tags and Gene Expression. *Journal of Plant Biology* 47, 244-253.
- Kim J.I., Murphy A.S., Baek D., Lee S.W., Yun D.J., Bressan R.A., Narasimhan M.L. (2011b).** YUCCA6 over-expression demonstrates auxin function in delaying leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. 62, 3981–3992.
- Kim J., Woo H.R., Nam H.G. (2016).** Toward Systems Understanding of Leaf Senescence: An Integrated Multi-Omics Perspective on Leaf Senescence Research. *Molecular Plant* 9, 813–825.
- King S.P., Badger M.R., Furbank R.T. (1998).** CO₂ refixation characteristics of developing canola seeds and silique wall. *Functional Plant Biology* 25, 377-386.
- Kinoshita T., Yamada K., Hiraiwa N., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. (1999).** Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *The Plant Journal* 19, 43-53.
- Kobe B., Kemp B.E. (1999).** Active-site-directed protein regulation. *Nature* 402, 373–376.
- Koeslin-Findeklee F., Meyer A., Girke A., Beckmann K., Horst W.J. (2014).** The superior nitrogen efficiency of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) hybrids is not related to delayed nitrogen starvation-induced leaf senescence. *Plant Soil* 384, 347-362.
- Koeslin-Findeklee F., Becker M.A., van der Graaff E., Roitsch T., Horst W.J. (2015).** Differences between winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) cultivars in nitrogen starvation-induced leaf senescence are governed by leaf-inherent rather than root-derived signals. *Journal of Experimental Botany* 66, 3669–3681.

Koizumi M., Yamaguchi-Shinozaki K., Tsuji H., Shinozaki K. (1993). Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 129, 175-182.

Kokubun N., Ishida H., Makino A., Mae T. (2002). The degradation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase into the 44-kDa fragment in the lysates of chloroplasts incubated in darkness. *Plant and Cell Physiology* 43, 1390-1395.

Kolodziejek ., Misas-Villamil J.C., Kaschani F., Clerc J., Gu C., Krahn D., Niessen S., Verdoes M., Willems L.I., Overkleeft H.S., Kaiser M., van der Hoorn R.A.L. (2011). Proteasome activity imaging and profiling characterizes bacterial effector Syringolin A. *Plant Physiology* 155, 477-489.

Koyama T. (2014). The roles of ethylene and transcription factors in the regulation of onset of leaf senescence. *Frontiers in Plant Science* 5, 650.

Krapp A., David L.C., Chardin C., Girin T., Marmagne A., Leprince A.S., Chaillou S., Ferrario-Mery S., Meyer C., Daniel-Vedele F. (2014). Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 65, 789-798.

Krupinska K. (2007). Fate and activities of plastids during leaf senescence. Chapter 22: Robert R. Wise and J. Kenneth Hooper (eds.), *The Structure and Function of Plastids*, 433-449.

Krupinska K., Mulisch M., Hollmann J., Tokarz K., Zschiesche W., Kage H., Humbeck K., Bilger W. (2012). An alternative strategy of dismantling of the chloroplasts during senescence observed in a high yield variety of barley. *Physiologia Plantarum* 144, 189-200.

Kurepa J., Smalle J.A. (2008). Structure, function and regulation of plant proteasomes. *Biochimie* 90, 324-335.

Kusaba M., Tanaka A., Tanaka R. (2013). Stay-green plants: what do they tell us about the molecular mechanism of leaf senescence. *Photosynthesis Research* 117, 221-234.

Kwon S.I., Hwang D.J. (2013). Expression Analysis of the Metacaspase Gene Family in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Biology* 56, 391-398.

L

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the heat bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Laîné P., Ourry A., Macduff J., Boucaud J., Salette J. (1993). Kinetic parameters of nitrate uptake by different catch crop species: effects of low temperatures or previous nitrate starvation. *Physiologia Plantarum* 88, 85-92.

Lassaletta L., Billen G., Grizzetti B., Anglade J., Garnier J. (2014). 50 year trends in nitrogen use efficiency of world cropping systems: the relationship between yield and nitrogen input to cropland. *Environmental Research Letters* 9, DOI:10.1088/1748-9326/9/10/105011.

Lee A.G. (2000). Membrane lipids : it's only a phase. *Current Biology* 10, R377-R379.

Lee I.C., Hong S.W., Whang S.S., Lim P.O., Nam H.G., Koo J.C. (2011). Age-dependent action of an ABA-inducible receptor kinase, RPK1, as a positive regulator of senescence in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell Physiology* 52, 651-62.

Lemaire G., Durand J.L., Lila M. (1989). Effet de la sécheresse sur la digestibilité *in vitro*, la teneur en ADF et la teneur en azote de la luzerne. *Agronomie* 9, 841-848.

- Lequeu J., Simon-Plas F., Fromentin J., Etienne P., Petitot A.S., Blein J.P., Suty L. (2005).** Proteasome comprising a $\beta 1$ inducible subunit acts as a negative regulator of NADPH oxidase during elicitation of plant defense reactions. *FEBS Letters* 579, 4879-4886.
- Leterme P. (1985).** Modélisation de la croissance et de la production des siliques chez le colza d'hiver; application à l'interprétation de résultats de rendements. Thèse de doctorat, Paris, 113p.
- Li J.R., Yu K., Wei J.R., Ma Q., Wang B.Q., Yu D. (2010).** Gibberellin retards chlorophyll degradation during senescence of *Paris polyphylla*. *Biologia Plantarum* 54, 395–399.
- Li Z., Peng J., Wen X., Guo H. (2012).** Gene network analysis and functional studies of senescence-associated genes reveal novel regulators of *Arabidopsis* leaf senescence. *Journal of Integrative Plant Biology* 54, 526–539.
- Lim P.O., Woo H.R., Nam H.G. (2003).** Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Trends in Plant science* 8, 272-278.
- Lim P.O., Kim H.J., Nam H.G. (2007).** Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology*. 58, 115-136.
- Lin Y.J., Cao M.L., Xu C.G., Chen H., Wei J., Zhang Q.F. (2002).** Cultivating rice with delaying leaf senescence by P-SAG12-IPT gene transformation. *Acta Botanica Sinica* 44, 1333–1338.
- Lin J.F., Wu S.H. (2004).** Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal* 39, 612-628.
- Ling J.Q., Kojima T., Shiraiwa M., Takahara H. (2003).** Cloning of two cysteine proteinase genes, *CysP1* and *CysP2*, from soybean cotyledons by cDNA representational difference analysis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1627, 129-39.
- Liu L., Zhou Y., Zhou G., Ye R., Zhao L., Li X., Lin Y. (2008b).** Identification of early senescence-associated genes in rice flag leaves. *Plant Molecular Biology* 67, 37–55.
- Liu L., Zhou Y., Szczerba M.W., Li X., Lin Y. (2010).** Identification and application of a rice senescence-associated promoter. *Plant Physiology* 153, 1239–1249.
- Liu H., Yang Q., Fan C., Zhao X., Wang X., Zhou Y. (2015).** Transcriptomic basis of functional difference and coordination between seeds and the silique wall of *Brassica napus* during the seed-filling stage. *Plant Science*, DOI:org/10.1016/j.plantsci.2015.01.015.
- Lobell D.B., Sibley A., Ortiz-Monasterio J.I. (2012).** Extreme heat effects on wheat senescence in India. *Nature Climate Change* 2, 186–189.
- Lohaus G., Moellers C. (2000).** Phloem transport of amino acids in two *Brassica napus* L. genotypes and one *B.carinata* genotype in relation to their seed protein content. *Planta* 211, 833-840.
- Lohaus G., Schwerdtfeger M. (2014).** Comparison of sugars, iridoid glycosides and amino acids in nectar and phloem sap of *Maurandya barclayana*, *Lophospermum erubescens*, and *Brassica napus*. *PLoS One* 9, e87689.
- Lohman K.N., Gan S., John M.C., Amasino R.M. (1994).** Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 92, 322-328.
- Long S.P., Zhu X.G., Naidu S.L., Ort D.R. (2006).** Can improvement in photosynthesis increase crop yields? *Plant, Cell and Environment* 29, 315-330.
- Lu Q., Wen X., Lu C., Zhang Q., Kuang T. (2003).** Photoinhibition and photoprotection in senescent leaves of field-grown wheat plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 41, 749-754.
- Lu H., Chandrasekar B., Oeljeklaus J., Misas-Villamil J.C., Wang Z., Shindo T., Bogyo M., Kaiser M., van der Hoorn R.A.L. (2015).** Subfamily-specific probes for Cys proteases display dynamic protease activities during seed germination. *Plant Physiology* 168, 1462-1475.

Luciński R., Misztal L., Samardakiewicz S., Jackowski G. (2011a). Involvement of Deg5 protease in wounding-related disposal of PsbF apoprotein. *Plant Physiology and Biochemistry* 49, 311-320.

Luciński R., Misztal L., Samardakiewicz S., Jackowski G. (2011b). The thylakoid protease Deg2 is involved in stress-related degradation of the photosystem II light-harvesting protein Lhcb6 in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 192, 74-86.

Lunn G.D., Bullard M.J., Holme S., Blunt R. (2003). Improvement in oilseed rape establishment by seed selection/seed treatment. Project Report 313, Home-Grown Cereals Authority, London.

M

Ma Q., Behboudian M., Turner N.C., Palta J.A. (2001). Gas exchange by pods and subtending leaves and internal recycling of CO₂ by pods of chickpea (*Cicer arietinum* L.) subjected to water deficits. *Journal of Experimental Botany* 52, 123-131.

Mae T., Makino A., Ohira K. (1983). Changes in the amounts of ribulose biphosphate carboxylase synthesized and degraded during the life span of rice leaf (*Oryza sativa* L.). *Plant and Cell Physiology* 24, 1079-1086.

Malagoli P., Lainé P., Le Deunff E., Rossato L., Ney B., Ourry A. (2004). Modeling nitrogen uptake in oilseed rape cv capitot during a growth cycle using kinetics of root nitrate transport systems and field experimental data. *Plant Physiology* 134, 388-400.

Malagoli P., Lainé P., Rossato L., Ourry A. (2005a). Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to harvest. II. An ¹⁵N-labelling-based simulation model of N partitioning between vegetative and reproductive tissues. *Annals of Botany* 95, 1187-1198.

Malagoli P., Lainé P., Rossato L., Ourry A. (2005b). Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to harvest: I. Global N flows between vegetative and reproductive tissues in relation to leaf fall and their residual N. *Annals of Botany* 95, 853-861.

Marino G., Huesgen P.F., Eckhard U., Overall C.M., Schröder W.P. (2014). Family-wide characterization of matrix metalloproteinases from *Arabidopsis thaliana* reveals their distinct proteolytic activity and cleavage site specificity. *Biochemical journal* 457, 335-346.

Martínez D.E., Bartoli C.G., Grbic V., Guamet J.J. (2007). Vacuolar cysteine proteases of wheat (*Triticum aestivum* L.) are common to leaf senescence induced by different factors. *Journal of Experimental Botany* 58, 1099-1107.

Martínez D.E., Costa M.L., Guamet J.J. (2008). Senescence-associated degradation of chloroplast proteins inside and outside the organelle. *Plant Biology* 10, 15-22.

Martínez D.E., Guamet J.J. (2014). Senescence-Related Changes in the Leaf Apoplast. *Journal of Plant Growth Regulation* 33, 44-55.

Martínez D.E., Borniego M.L., Battchikova N., Aro E.M., Tyystjärvi E., Guamét J.J. (2015). SASP, a Senescence-Associated Subtilisin Protease, is involved in reproductive development and determination of siliques number in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 66, 161-174.

Masclaux C., Valadier M.H., Brugière N., Morot-Gaudry J.F., Hirel B. (2000). Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* 21, 510-518.

- Masclaux-Daubresse C., Reisdorf-Cren M., Pageau K., Lelandais M., Grandjean O., Kronenberger J., Valadier M.H., Feraud M., Jouglet T., Suzuki A. (2006).** Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. *Plant Physiology* 140, 444-456.
- Masclaux-Daubresse C., Daniel-Vedele F., Dechorgnat J., Chardon F., Gaufichon L., Suzuki A. (2010).** Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* 105, 1141-1157.
- Masclaux-Daubresse C., Clément G., Anne P., Routaboul J.M., Guiboileau A., Soulay F., Shirasu K., Yoshimoto K. (2014).** Stitching together the multiple dimensions of autophagy using metabolomics and transcriptomics reveals impacts on metabolism, development, and plant responses to the environment in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. Online Publication.
- Masferrer A., Arro M., Manzano D., Schaller H., Fernandez-Busquets X., Moncalean P., Fernandez B., Cunillera N., Boronat A., Ferrer A. (2002).** Overexpression of *Arabidopsis thaliana* farnesyl diphosphate synthase (FPS1S) in transgenic *Arabidopsis* induces a cell death/senescence-like response and reduced cytokinin levels. *The Plant Journal* 30, 123-132.
- Matile P. (1992).** Chloroplast senescence. In: Baker NR, Thomas H, eds. *Crop photosynthesis: spatial and temporal determinants*. Amsterdam: Elsevier, 413-440.
- Matile P., Hörtensteiner S., Thomas H., Kräutler B. (1996).** Chlorophyll breakdown in senescent leaves. *Plant Physiology* 112, 1403-1409.
- Mawson R., Heaney R.K., Zdunczyk Z., Kozłowska H. (1993).** Rapeseed meal-glucosinolates and their antinutritional effects Part II. Flavour and palatability. *Food/Nahrung* 37, 336-344.
- Mawson R., Heaney R.K., Zdunczyk Z., Kozłowska H. (1994a).** Rapeseed meal-glucosinolates and their antinutritional effects Part 3. Animal growth and performance. *Food/Nahrung* 38, 167-177.
- Mawson R., Heaney R.K., Zdunczyk Z., Kozłowska H. (1994b).** Rapeseed meal-glucosinolates and their antinutritional effects Part 4. Goitrogenicity and internal organs abnormalities in animals. *Food/Nahrung* 38, 178-191.
- McRae D.G., Thompson J.E. (1983).** Senescence-dependent changes in superoxide anion production by illuminated chloroplasts from bean leaves. *Planta* 158, 185-193.
- McWilliam S.C., Stokes D.T., Scott R.K. (1998).** Establishment of oilseed rape: the influence of physical characteristics of seedbeds and weather on germination, emergence and seedling survival. H.G.C.A. Project Report No OS31 99p.
- Merrien A., Palleau J.P., Maisonneuve C. (1988).** Mineral element requirements of rape cultivated in France. *Physiologie et élaboration du rendement du colza*. Paris: Cetiom Editions, 34-46.
- Merrien A., Pouzet A. (1988).** Principaux facteurs limitant les rendements de colza d'hiver dans les conditions française *Physiologie et élaboration du rendement du colza d'hiver*. Paris: CETIOM-INRA, 16-22.
- Mi G.H., Tang L., Zhang F., Zhang J.H. (2002).** Carbohydrate storage and utilization during grain filling as regulated by nitrogen application in two wheat cultivars. *Journal of Plant Nutrition* 25, 213-229.
- Miao Y., Laun T.M., Zimmermann P., Zentgraf U. (2004).** Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 55, 853-867.
- Miao Y., Zentgraf U. (2007).** The antagonist function of *Arabidopsis* WRKY53 and ESR/ESP in leaf senescence is modulated by the jasmonic and salicylic acid equilibrium. *The Plant Cell* 19, 819-30.

Milford G.F.J., Shield I.F., Stevenson H.J., Scott T., Leach J.E. (1999). Seed and pod development of autumn-sown, determinate white lupins (*Lupinus albus*) in relation to the assimilation and distribution of dry matter and nitrogen in crops grown at different densities. *Journal of Agricultural Science* 133, 141–150.

Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Science* 9, 490-498.

Moll R.H., Kamprath E.J., Jackson W.A. (1982). Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. *Agronomy Journal* 74, 562-564.

Moore B., Zhou L., Rolland F., Hall Q., Cheng W.H., Liu Y.- X., Hwang I., Jones T., Sheen J. (2003). Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* 300, 332–336.

Morimoto K., van der Hoorn R.A.L. (2016). The increasing impact of activity-based protein profiling in plant science. *Plant Cell Physiology* 0, 1–16.

Morris K., Mackerness S.A.H., Page T., John C.F., Murphy A.M., Carr J.P., Buchanan-Wollaston V. (2000). Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant Journal* 23, 677–685.

Mosier A.R. (2002). Environmental challenges associated with needed increases in global nitrogen fixation. *Nutrient Cycling in Agrosystems* 63, 101-116.

Mueller-Roeber B., Balazadeh S. (2014). Auxin and Its Role in Plant Senescence. *Journal of Plant Growth Regulation* 33, 21–33.

Müntz K. (2007). Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles. *Journal of Experimental Botany* 58, 2391-2407.

N

Nakabayashi K., Ito M., Kiyosue T., Shinozaki K., Watanabe A. (1999). Identification of *clp* genes expressed in senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell Physiology* 40, 504-514.

Nakano T., Murakami S., Shoji T., Yoshida S., Yamada Y., Sato F., (1997). A novel protein with DNA binding activity from tobacco chloroplast nucleoids. *Plant Cell* 9, 1673–1682.

Nési N., Delourme R., Brégeon M., Falentin C., Renard M. (2008). Genetic and molecular approaches to improve nutritional value of *Brassica napus* L. seed. *Comptes rendus Biologies* 331, 763-771.

Nickel S., Kaschani F., Colby T., van der Hoorn R.A.L., Kaiser M. (2011). A para-nitrophenol phosphonate probe labels distinct serine hydrolases of *Arabidopsis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20, 601-606.

Nixon P.J., Michoux F., Yu J., Boehm M., Komenda J. (2010). Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II. *Annals of Botany* 106, 1–16.

Noh Y.S., Amasino R.M. (1999). Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of *SAG12*. *Plant Molecular Biology* 41, 181-194.

Noodén L.D., Hillsberg J.W., Schneider M.J. (1996). Induction of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* by long days through a light-dosage effect. *Physiologia Plantarum* 96, 491–495.

Noquet C., Avice J.C., Rossato L., Beauclair P., Henry M.P., Ourry A. (2004). Effects of altered source-sink relationships on N allocation and vegetative storage protein accumulation in *Brassica napus* L.. *Plant Science* 166, 1007-1018.

Nyikako J., Schierholt A., Kessel B., Becker H.C. (2014). Genetic variation in nitrogen uptake and utilization efficiency in a segregating DH population of winter oilseed rape. *Euphytica* 199, 3–11.

O

Obara K., Kuriyama H., Fukuda H. (2001). Direct Evidence of Active and Rapid Nuclear Degradation Triggered by Vacuole Rupture during Programmed Cell Death in *Zinnia*. *Plant Physiology* 125, 615-626.

Oh S.A., Park J.H., Lee G.I., Paek K.H., Park S.K., Nam H.G. (1997). Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 12, 527–535.

Olinares P.D.B., Kim J., van Wijk K.J. (2011). The Clp protease system: a central component of the chloroplast protease network. *Biochimica and Biophysica Acta* 1807, 999-1011.

Ondzighi C.A., Christopher D.A., Cho E.J., Chang S.C., Staehelin L.A. (2008). *Arabidopsis* protein disulfide isomerase-5 inhibits cysteine proteases during trafficking to vacuoles before programmed cell death of the endothelium in developing seeds. *The Plant Cell* 20, 2205–2220.

Ono K., Hashimoto H., Katoh S. (1995). Changes in the number and size of chloroplasts during senescence of primary leaves of wheat grown under different conditions. *Plant and Cell Physiology* 36, 9–17.

Ono Y., Wada S., Izumi M., Makino A., Ishida H. (2013). Evidence for contribution of autophagy to Rubisco degradation during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* 36, 1147–1159.

Orsel M., Moison M., Clouet V., Thomas J., Leprince F., Canoy A.S., Just J., Chalhoub B., Masclaux-Daubresse C. (2014). Sixteen cytosolic glutamine synthetase genes identified in the *Brassica napus* L. genome are differentially regulated depending on nitrogen regimes and leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 65, 3927-3947.

Otegui M., Noh Y.S., Martinez D.E., Petroff M.G.V., Staehelin L.A., Amasino R.M., Guamet J.J. (2005). Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean. *The Plant Journal* 41, 831-844.

Ougham H.J., Morris P., Thomas H. (2005). The colors of autumn leaves as symptoms of cellular recycling and defenses against environmental stresses. *Current Topics in Developmental Biology* 66, 135–160.

P

Pak J.H., Liu C.Y., Huangpu J., Graham J.S. (1997). Construction and characterization of the soybean leaf metalloproteinase cDNA. *FEBS Letters* 404, 283–288.

Pan X., Welti R., Wang X. (2010). Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Nature Protocols* 5, 986-992.

Papas A., Ingalls J.R., Campbell L.D. (1979). Studies on the effects of rapeseed meal on thyroid status of cattle, glucosinolate and iodine content of milk and other parameters. *The journal of nutrition* 109, 1129-1139.

Park J.H., Oh S.A., Kim Y.H., Woo H.R., Nam H.G. (1998). Differential expression of senescence associated mRNAs during leaf senescence induced by different senescence-inducing factors in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 37, 445-454.

Parrott D.L., McInnerney K., Feller U., Fischer A.M. (2007). Steam-girdling of barley (*Hordeum vulgare*) leaves leads to carbohydrate accumulation and accelerated leaf senescence, facilitating transcriptomic analysis of senescence-associated genes. *New Phytologist* 176, 56-59.

Parrott D.L., Martin J.M., Fischer A.M. (2010). Analysis of barley (*Hordeum vulgare*) leaf senescence and protease gene expression: a family C1A cysteine protease is specifically induced under conditions characterized by high carbohydrate, but low to moderate nitrogen levels. *New Phytologist* 187, 313-331.

Pastori G.M., Del Rio L.A. (1997). Natural senescence of pea leaves (an activated oxygen-mediated function for peroxisomes). *Plant Physiology* 113, 411-418.

Patricelli M.P., Giang D.K., Stamp L.M., Burbaum J.J. (2001). Direct visualization of serine hydrolase activities in complex proteomes using fluorescent active site-directed probes. *Proteomics* 1, 1067-1071.

Peltier J.B., Ytterberg J., Liberles D.A., Roepstorff P. (2001). Identification of a 350-kDa Clp protease complex with 10 different Clp isoforms in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 16318-16327.

Peltier J.B., Ripoll D.R., Friso G., Rudella A., Cai Y., Ytterberg J., Giacomelli L., Pillardy J., van Wijk K.J. (2004). Clp Protease Complexes from Photosynthetic and Non-photosynthetic Plastids and Mitochondria of Plants, Their Predicted Three-dimensional Structures, and Functional Implications. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 4768-4781.

Peng M., Hudson D., Schofield A., Tsao R., Yang R., Gu H., Bi Y.M., Rothstein S.J. (2008). Adaptation of *Arabidopsis* to nitrogen limitation involves induction of anthocyanin synthesis which is controlled by the *NLA* gene. *Journal of Experimental Botany* 59, 2933-2944.

Peoples M.B., Dalling M.J. (1988). The interplay between proteolysis and amino acids metabolism during senescence and nitrogen reallocation. In: Noodén L.D., Leopold A.C., eds. *Senescence and aging in plants*. San Diego: Academic Press, 181-217.

Pontier D., Gan S., Amasino R.M., Roby D., Lam E. (1999). Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. *Plant Molecular Biology* 39, 1243-1255.

Poret M., Chandrasekar B., van der Hoorn R.A.L., Avice J.C. (2016). Characterization of senescence-associated protease activities involved in the efficient protein remobilization during leaf senescence of winter oilseed rape. *Plant Science* 246, 139-153.

Prasch C., Sonnewald U. (2013). Simultaneous application of heat, drought, and virus to *Arabidopsis* plants reveals significant shifts in signaling networks. *Plant Physiology* 162, 1849-1866.

Prins A., van Heerden P.D.R., Olmos E., Kunert K.J., Foyer C.H. (2008). Cysteine proteinases regulate chloroplast protein content and composition in tobacco leaves: a model for dynamic interactions with ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) vesicular bodies. *Journal of Experimental Botany* 59, 1935-1950.

Pružinská A., Tanner G., Aubry S., Anders I., Moser S., Müller T., Ongania K.H., Krautler B., Youn Y.J., Liljegren S.J., Hortensteiner S. (2005). Chlorophyll breakdown in senescent *Arabidopsis* leaves. Characterization of chlorophyll catabolites and of chlorophyll catabolic enzymes involved in the degreening reaction. *Plant Physiology* 139, 52-63.

Q

Qin T., Fu J., Zhang N., Du L. (2006). Comparative studies of senescence-related enzymes in the cotyledon of chlorophyll b-deficient mutant and its wild type oilseed rape during senescence. *Plant Science* 171, 293-299.

Quirino B.F., Noh Y.S., Himelblau E., Amasino R.M. (2000). Molecular aspects of leaf senescence. *Trends In Plant Science* 5, 278-282.

R

- Rathke G.W., Christen O., Diepenbrock W. (2005).** Effects of nitrogen source and rate on productivity and quality of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) grown in different crop rotations. *Field Crops Research* 94, 103-113.
- Rathke G.W., Behrens T., Diepenbrock W. (2006).** Integrated nitrogen management strategies to improve seed yield, oil content and nitrogen efficiency of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): A review. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 117, 80-108.
- Rautergarten C., Steinhäuser D., Büssis D., Stintzi A., Schaller A., Kopka J., Altmann T. (2005).** Inferring hypothesis on functional relationships of genes: analysis of the *Arabidopsis thaliana* subtilase gene family. *PLoS Computational Biology* 1, 297-312.
- Rawlings N.D., Barret A.J., Finn R. (2016).** Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research* 44, 343-350.
- Reviron M.P., Vartanian N., Sallantin M., Huet J.C., Pernollet J.C., de Vienne D. (1992).** Characterization of a novel protein induced by progressive or rapid drought and salinity in *Brassica napus* leaves. *Plant Physiology* 100, 1486-1493.
- Richards R.A. (2000).** Selectable traits to increase crop photosynthesis and yield of grain crops. *Journal of Experimental Botany* 51, 447-458.
- Richau K.H., Kaschani F., Verdoes M., Pansuriya T.C., Niessen S., Stüber K., Colby T., Overkleeft H.S., Bogyo M., van der Hoorn R.A.L. (2012).** Subclassification and biochemical analysis of plant papain-like cysteine proteases displays subfamily-specific characteristics. *Plant Physiology* 158, 1583-99.
- Roberts I., Murray P.F., Passeron S., Barneix A.J. (2002).** The activity of the 20S proteasome is maintained in detached wheat leaves during senescence in darkness. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 161-166.
- Roberts I.N., Murray P.F., Caputo C.P., Passeron S., Barneix A.J. (2003).** Purification and characterization of a subtilisin-like serine protease induced during the senescence of wheat leaves. *Physiologia Plantarum* 118, 483-490.
- Roberts I.N., Passeron S., Barneix A.J. (2006).** The two main endopeptidases present in dark-induced senescent wheat leaves are distinct subtilisin-like proteases. *Planta* 224, 1437-1447.
- Roberts I.N., Caputo C., Kade M., Criado M.V., Barneix A. (2011).** Subtilisin-like serine proteases involved in N remobilization during grain filling in wheat. *Acta Physiologiae Plantarum* 33, 1997-2001.
- Roberts I.N., Caputo C., Criado M.V., Funk C. (2012).** Senescence-associated proteases in plants. *Physiologia Plantarum* 145, 130-139.
- Rojo E., Zouhar J., Carter C., Kovaleva V., Raikhel N.V. (2003).** A unique mechanism for protein processing and degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100, 7389-7394.
- Rojo E., Martin R., Carter C., Zouhar J., Pan S., Plotnikova J., Jin H., Paneque M., Sanchez-Serrano J.J., Baker B., Ausubel F.M., Raikhel N.V. (2004).** VPE γ exhibits a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens. *Current Biology* 14, 1897-1906.
- Rolland F., Moore B., Sheen J. (2002).** Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell* 14, S185-S205.
- Rothstein S.J. (2007).** Returning to our roots: Making plant biology research relevant to future challenges in agriculture. *Plant Cell* 19, 2695-2699.

Rossato L., Laïné P., Ourry A. (2001) Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. *Journal of Experimental Botany* 52, 1655-1663.

Rossato L., MacDuff J.H., Laïné P., Le Deunff E., Ourry A. (2002). Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: effects of methyl jasmonate on nitrate uptake, senescence, growth, and VSP accumulation. *Journal of Experimental Botany* 53, 1131-1141.

Ruuska S.A., Lewis D.C., Kennedy G., Furbank R.T., Jenkins C.L.D., Tabe L.M. (2008). Large scale transcriptome analysis of the effects of nitrogen nutrition on accumulation of stem carbohydrate reserves in reproductive stage wheat. *Plant Molecular Biology* 66, 15-32.

S

Salon C., Bataillé M.P., Gallardo K., Jeudy C., Santoni A.L., Trouverie J., Voisin A.S., Avice J.C. (2014). ³⁴S and ¹⁵N labelling to model S and N flux in plants and determine the different components of N and S use efficiency. *Plant Metabolic Flux Analysis Methods in Molecular Biology* 1090, 335-346.

Salzman R.A., Brady J.A., Finlayson S.A., Buchanan C.D., Summer E.J., Sun F., Klein P.E., Klein R.R., Pratt L.H., Cordonnier-Pratt M.M., Mullet J.E. (2005). Transcriptional Profiling of Sorghum Induced by Methyl Jasmonate, Salicylic Acid, and Aminocyclopropane Carboxylic Acid Reveals Cooperative Regulation and Novel Gene Response. *Plant Physiology* 138, 352–368.

Sanmartín M., Jaroszewski L., Raikhel N.V., Rojo E. (2005). Caspases. Regulating death since the origin of life. *Plant Physiology* 137, 841-847.

Sarwat M., Naqvi A.R., Ahmad P., Ashraf M., Akram N.A. (2013). Phytohormones and microRNAs as sensors and regulators of leaf senescence: Assigning macro roles to small molecules. *Biotechnology Advances* 31, 1153–1171.

Schaller A. (2004). A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220, 183-197.

Schaller A., Stintzi A., Graff L. (2012). Subtilases – versatile tools for protein turnover, plant development, and interactions with the environment. *Physiologia Plantarum* 145, 52-66.

Schiltz S., Gallardo K., Huart M., Negroni L., Sommerer N., Burstin J. (2004). Proteome reference maps of vegetative tissues in pea. An investigation of nitrogen mobilization from leaves during seed filling. *Plant Physiology* 135, 2241-2260.

Schiltz S., Munier-Jolain N., Jeudy C., Burstin J., Salon C. (2005). Dynamics of exogenous nitrogen partitioning and nitrogen remobilization from vegetative organs in pea revealed by ¹⁵N in vivo labeling throughout seed filling. *Plant Physiology* 137, 1463-1473.

Schippers J.H.M., Jing H.C., Hille J., Dijkwel P.P. (2007). Developmental and hormonal control of leaf senescence. In: Gan S (ed) *Senescence Processes in Plants*. Blackwell, Oxford, 145–170.

Schjoerring J.K., Bock J.G.H., Gammelvind L., Jensen C.R., Mogensen V.O. (1995). Nitrogen incorporation and remobilization in different shoot components of field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) as affected by rate of nitrogen application and irrigation. *Plant and Soil* 177, 255-264.

Schnug E., Haneklaus S., Murphy D. (1993). Impact of Sulphur fertilization on fertilizer nitrogen efficiency. *Sulphur Agric.* 17, 8–12.

Schommer C., Palatnik J.F., Aggarwal P., Chételat A., Cubas P., Farmer E.E., Nath U., Weigel D. (2008). Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS Biology* 6, e230.

Schulte auf'm Erley G., Wijaya K.A., Ulas A., Becker H., Wiesler F., Horst W.J. (2007). Leaf senescence and N uptake parameters as selection traits for nitrogen efficiency of oilseed rape cultivars. *Physiologia Plantarum* 130, 519-531.

- Schulte auf'm Erley G., Behrens T., Ulas A., Wiesler F., Horst W.J. (2011).** Agronomic traits contributing to nitrogen efficiency of winter oilseed rape cultivars. *Field Crops Research* 124, 114-123.
- Schuhmann H., Adamska I. (2012).** Deg proteases and their role in protein quality control and processing in different subcellular compartments of the plant cell. *Physiologia Plantarum* 145, 224-234.
- Seltmann M.A., Stingl N.E., Lautenschlaeger J.K., Krischke M., Mueller M.J., Berger S. (2010).** Differential Impact of lipoxygenase 2 and jasmonates on natural and stress-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 152, 1940-1950.
- Sexton R., Roberts J.A. (1982).** Cell biology of abscission. *Annual Review in Plant Physiology* 33, 132-162.
- Simova-Stoilova L., Vaseva I., Grigorova B., Demirevska K., Feller U. (2010).** Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 200-206.
- Simpson S.D., Nakashima K., Narusaka Y., Seki M., Shinizaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2003).** Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *The Plant Journal* 33, 259-270.
- Shen F., Yu S., Xie Q., Han X., Fan S. (2006).** Identification of genes associated with cotyledon senescence in upland cotton. *Chinese Science Bulletin* 51, 1085-1094.
- Smalle J., Vierstra R.D. (2004).** The ubiquitine 26S proteasome proteolytic pathway. *Annual Review of Plant Biology* 55, 555-590.
- Smillie R.M., Hetherington S.E. (1999).** Photoabatement by anthocyanin shields photosynthetic systems from light stress. *Photosynthetica* 36, 451-463.
- Snowden K.C., Simkin A.J., Janssen B.J., Templeton K.R., Loucas H.M., Simons J.L., Karunairetnam S., Gleave A.P., Clark D.G., Klee H.J. (2005).** The Decreased apical dominance1/*Petunia* hybrid CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development. *Plant Cell* 17, 746-759.
- Solomon M.B., Lynch G.P., Paroczay E., Norton S. (1991).** Influence of rapeseed meal, whole rapeseed, and soybean meal on fatty acid composition and cholesterol content of muscle and adipose tissue from ram lambs. *Journal of Animal Science* 69, 4055-4061.
- Sorin C., Musse M., Mariette F., Bouchereau A., Leport L. (2014).** Assessment of nutrient remobilization through structural changes of palisade and spongy parenchyma in oilseed rape leaves during senescence. *Planta*, 1-14.
- Srivalli B., Bharti S., Khanna-Chopra R. (2001).** Vacuole cysteine proteases and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase degradation during monocarpic senescence in cowpea leaves. *Photosynthetica* 39, 87-93.
- Stewart A.J., Chapman W., Jenkins G.I., Graham I., Martin T., Crozier A. (2001).** The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant Cell Environment* 24, 1189-1197.
- Stressman D., Miller A., Spalding M., Rodermeel S.R. (2002).** Regulation of photosynthesis during leaf development in continuous light. *Photosynthesis Research* 72, 27-37.
- Stroeher V., Maclagan J.L., Good A.G. (1997).** Molecular cloning of a *Brassica napus* cysteine protease gene inducible by drought and low temperature stress. *Physiologia Plantarum* 101, 389-397.
- Sullivan J.A., Shirasu K., Deng X.W. (2003).** The diverse roles of ubiquitine and the 26S proteasome in the life of plants. *Nature Review Genetic* 4, 948-958.

Sun X., Fu T., Chen N., Guo J., Ma J., Zou M., Lu C., Zhang L. (2010a). The stromal chloroplast Deg7 protease participates in the repair of photosystem II after photoinhibition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 152, 1263-1273.

Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R., Miller G. (2012) ROS and redox signaling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environment* 35, 259–270.

Svecnjak Z., Rengel Z. (2006). Canola cultivars differ in nitrogen utilization efficiency at vegetative stage. *Field Crops Research* 97, 221-226.

Sylvester-Bradley R., Kindred D.R. (2009). Analysis nitrogen responses of cereals to prioritize routes to the improvement of nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany* 60, 1939-1951.

T

Tajima T., Yamaguchi A., Matsushima S., Satoh M., Hayasaka S., Yoshimatsu K., Shioi Y. (2011). Biochemical and molecular characterization of senescence-related cysteine protease-cystatin complex from spinach leaf. *Physiologia Plantarum* 141, 97-116.

Tan H., Xiang X., Tang J., Wang X. (2016). Nutritional functions of the funiculus in *Brassica napus* seed maturation revealed by transcriptome and dynamic metabolite profile analyses. *Plant Molecular Biology*, DOI: 10.1007/s11103-016-0530-3.

Tegeder M., Rentsch D. (2010). Uptake and Partitioning of Amino Acids and Peptides. *Molecular Plant* 3, 997-1011.

Thoenen M., Feller U. (1998). Degradation of glutamine synthetase in intact chloroplasts isolated from pea (*Pisum sativum*) leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 25, 279-286.

Thoenen M., Herrmann B., Feller U. (2007). Senescence in wheat leaves: is a cysteine endopeptidase involved in the degradation of the large subunit of Rubisco? *Acta Physiologiae Plantarum* 29, 339-350.

Thomas H., Howarth C.J. (2000). Five ways to stay green. *Journal of Experimental Botany* 51, 329–337.

Thomas H., Ougham H. (2014). The stay-green trait. *Journal of Experimental Botany* 65, 3889- 3900.

Thomas H., Smart C.M. (1993). Crops that stay green. *Annals of Applied Biology* 123, 193–219.

Thomas H., Stoddart J. (1980). Leaf senescence. *Annual Review of Plant Physiology* 31, 83-111.

Tilman D., Cassman K.G., Matson P.A., Naylor R., Polasky S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418, 671-677.

Tilsner J., Kassner N., Struck C., Lohaus G. (2005). Amino acid contents and transport in oilseed rape (*Brassica napus* L.) under different nitrogen conditions. *Planta* 221, 328-338.

Tittonel E.D., Chaput J.P., Letoublon F., Bonnot O. (1988). Besoins en éléments minéraux du colza cultivé en France. *Physiologie et élaboration du rendement Colza*. Paris: CETIOM, 68- 72.

Toyooka K., Okamoto T., Minamikawa T. (2001). Cotyledon cells of *Vigna mungo* seedlings use at least two distinct autophagic machineries for degradation of starch granules and cellular components. *The Journal of Cell Biology* 154, 973-82.

Tran V., Weier D., Radchuk R., Thiel J., Radchuk V. (2014). Caspase-Like Activities Accompany Programmed Cell Death Events in Developing Barley Grains. *PLoS ONE* 9, DOI:10.1371/journal.pone.0109426.

Tripathi L.P., Sowdhamini R. (2006). Cross genomic of serine proteases in *Arabidopsis* and rice. BMC Genomics 7, 200.

Tsay Y.F., Chiu C.C., Tsai C.B., Ho C.H., Hsu P.K. (2007). Nitrate transporters and peptide transporters. FEBS Letters 581, 2290-2300.

Tsiatsiani L., Van Breusegem F., Gallois P., Zaviyalov A., Lam E., Bozhkov P.V. (2011b). Metacaspases. Cell Death and Differentiation 18, 1279–1288.

Tsuchisaka A., Yu G., Jin H., Alonso J.M., Ecker J.R., Zhang X., Gao S., Theologis A. (2009). A combinatorial interplay among the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate isoforms regulates ethylene biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Genetics 183, 979–1003.

U

U.N. (1935). Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilisation. Journal of Japanese Botany 7, 389-452.

Ulas A., Behrens T., Wiesler F., Horst W.J., Schulte auf m Erley G. (2013). Does genotypic variation in nitrogen remobilisation efficiency contribute to nitrogen efficiency of winter oilseed-rape cultivars (*Brassica napus* L.). Plant Soil 371, 463-471.

V

van der Graaff E., Schwacke R., Schneider A., Desimone M., Flugge U.I., Kunze R. (2006). Transcription analysis of arabidopsis membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. Plant Physiology 141, 776–792. *

van der Hoorn R.A.L., Leeuwenburgh M.A., Bogyo M., Joosten M.H.A.J., Peck S.C. (2004). Activity profiling of papain-like cysteine proteases in plants. Plant Physiology 135, 1170-1178.

van der Hoorn R.A.L. (2008). Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. Annual Review Plant Biology 59, 191-223.

van der Hoorn R. A. L., Colby T., Nickel S., Richau K.H., Schmidt J., Kaiser M. (2011). Mining the active proteome of *Arabidopsis thaliana*. Frontiers in Plant Science 2, 89.

van der Hoorn R.A.L., Kaiser M. (2012). Probes for activity-based profiling of plant proteases. Physiologia Plantarum 145, 18-27.

Vandermeiren K., De Bock M., Horemans N., Op De Beeck M., Ceulemans R., Guisez I., De Temmerman L. (2009). Impact of tropospheric ozone on food and feed quality of brassica species “OFFQ”. Final Report Phase I. Brussels: Belgian Science Policy, 54 p. (Research Programme Science for a Sustainable Development).

Vieira M., Pissarra J., Veríssimo P., Castanheira P., Costa Y., Pires E., Faro C. (2001). Molecular cloning and characterization of cDNA encoding cardosin B, an aspartic proteinase accumulating extracellularly in the transmitting tissue of *Cynara cardunculus* L. Plant Molecular Biology 45, 529-539.

Vierstra R.D. (2003). The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. Trends in Plant Science 8, 135-142.

Vlot A.C., Liu P.P., Cameron R.K., Park S.W., Yang Y., Kumar D., Zhou F., Padukkavidana T., Gustafsson C., Picherski E., Klessig D.F. (2008). Identification of likely orthologs of tobacco salicylic acid binding protein 2 and their role in systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 53, 445–456.

Von der Haar D., Müller K., Bader-Mittermaier S., Eisner P. (2014). Rapeseed proteins-Production methods and possible application ranges. *Oilseeds & fats Crops and Lipids* 21 (1), DOI: 10.1051/ocl/2013038.

W

Wada S., Ishida H., Izumi M., Yoshimoto K., Ohsumi Y., Mae T., Makino A. (2009). Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiology* 149, 885-893.

Wagner R., Aigner H., Pružinská A., Jänkänpää H.J., Jansson S., Funk C. (2011). Fitness analyses of *Arabidopsis thaliana* mutants depleted of FtsH metalloproteases and characterization of three FtsH6 deletion mutants exposed to high light stress, senescence and chilling. *New Phytologist* 191, 449-458.

Wagner R., Aigner H., Funk C. (2012). FtsH proteases located in the plant chloroplast. *Physiologia Plantarum* 145, 203-214.

Wagstaff C., Yang T.J.W., Stead A.D., Buchanan-Wollaston V., Roberts J.A. (2009). A molecular and structural characterization of senescing *Arabidopsis* siliques and comparison of transcriptional profiles with senescing petals and leaves. *The Plant Journal* 57, 690-705.

Walker K.C., Booth E.J. (2001). Agricultural aspects of rape and other *Brassica* products. *European Journal of Lipid Science and Technology* 103, 441-446.

Wang Y.T., Yang C.Y., Chen Y.T., Lin Y., Shaw J.F. (2004). Characterization of senescence associated proteases in postharvest broccoli florets. *Plant Physiology and Biochemistry* 42, 663-670.

Wang S., Blumwald E. (2014). Stress-induced chloroplast degradation in *Arabidopsis* is regulated via a process independent of autophagy and senescence-associated vacuoles. *Plant Cell* 26, 4875-88.

Watanabe N., Lam E. (2011). *Arabidopsis* metacaspase 2d is a positive mediator of cell death induced during biotic and abiotic stresses. *The Plant Journal* 66, 969-982.

Watanabe M., Balazadeh S., Tohge T., Erban A., Giavalisco P., Kopka J., Mueller-Roeber B., Fernie A.R., Hoefgen R. (2013). Comprehensive dissection of spatiotemporal metabolic shifts in primary, secondary, and lipid metabolism during developmental senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 162, 1290-1310.

Weaver L.M., Gan S., Quirino B., Amasino R.M. (1998). A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Molecular Biology* 37, 455-69.

Weaver L.M., Amasino R.M. (2001). Senescence is induced in individually darkened *Arabidopsis* leaves, but inhibited in whole darkened plants. *Plant Physiology* 127, 876-886.

Wiederanders B. (2003). Structure-function relationship in class CA1 cysteine peptidases. *Acta Biochimica Polonica* 50, 691-713.

Wiesler F., Behrens T., Horst W.L. (2001b). Nitrogen efficiency of contrasting rape ideotypes. In: Horst WJ, ed. *Plant nutrition - Food security and sustainability of agro-ecosystems*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 60-61.

Wingler A., Purdy S., MacLean J.A., Pourtau N. (2006). The role of sugars in integrating environmental signal during the regulation of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 57, 391-399.

Woo H.R., Chung K.M., Park J.H., Oh S.A., Ahn T., Hong S.H., Jang S.K., Nam H.G. (2001). ORE9, an F-box protein that regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 13, 1779-1790.

Wu X.Y., Kuai B.K., Jia I.Z., Jing H.C. (2012). Regulation of Leaf Senescence and Crop Genetic Improvement. *Journal of Integrative Plant Biology* 54, 936–952.

Y

Yamada K., Matsushima R., Nishimura M., Hara-Nishimura I. (2001). A slow maturation of a cysteine protease with a granulins domain in the vacuoles of senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology* 127, 1626-1634.

Yamauchi D. (2007). Hormonal regulation of the expression of cysteine proteinase genes in germinated cotyledons of common bean seeds. *Plant Biotechnology* 24, 231–235.

Yamburenko M.V., Zubo Y.O., Vanková R., Kusnetsov V.V., Kulaeva O.N., Börner T. (2013). Abscisic acid represses the transcription of chloroplast genes. *Journal of Experimental Botany* 64, 4491-502.

Yang J., Zhang J. (2006). Grain filling of cereals under soil drying. *New Phytologist* 169, 223-36.

Yang Y., Xu R., Ma C., Vlot A.C., Klessig D.F., Pichersky E. (2008). Inactive methyl indole-3-acetic acid ester can be hydrolyzed and activated by several esterases belonging to the AtMES esterase family of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 147, 1034–1045.

Yin Y., Wang Z.Y., Mora-Garcia S., Li J., Yoshida S., Asami T., Chory J. (2002). BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* 109, 181–191.

Yu K., Wei J., Ma Q., Yu D., Li J. (2009a). Senescence of aerial parts is impeded by exogenous gibberellic acid in herbaceous perennial *Paris polyphylla*. *Journal of Plant Physiology* 166, 819–830.

Yu K., Wang Y., Wei J., Ma Q., Yu D., Li J. (2009b). Improving rhizome yield and quality of *Paris polyphylla* through gibberellic acid-induced retardation of senescence of aerial parts. *Plant Signal Behavior* 4, 413–415.

Z

Zavaleta-Mancera H., Franklin K., Ougham H., Thomas H., Scott I. (1999a). Regreening of senescent *Nicotiana* leaves. II. Redifferentiation of plastids. *Journal of Experimental Botany* 50, 1683-1689.

Zelisko A., Jackowski G. (2004). Senescence-dependent degradation of Lhcb3 is mediated by a thylakoid membrane-bound protease. *Journal of Plant Physiology* 161, 1157-1170.

Zelisko A., García-Lorenzo M., Jackowski G., Jansson S., Funk C. (2005). *AtFtsH6* is involved in the degradation of the light-harvesting complex II during high-light acclimation and senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102, 13699–13704.

Zeng X.F., Zhao D.G. (2016). Expression of IPT in Asakura-sanshoo (*Zanthoxylum piperitum* (L.) DC. f. inerme Makino) Alters Tree Architecture, Delays Leaf Senescence, and Changes Leaf Essential Oil Composition. *Plant Molecular Biology Rep* 34, 649–658.

Zhang L.F., Rui Q., Zhang P., Wang X.Y., Xu L.L. (2007). A novel 51-kDa fragment of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase formed in the stroma of chloroplasts in dark-induced senescing wheat leaves. *Physiologia Plantarum* 131, 64-71.

Zhang K., Gan S.S. (2012). An abscisic acid-AtNAP transcription factor-SAG113 protein phosphatase 2C regulatory chain for controlling dehydration in senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology* 158, 961-969.

Zhang K., Xia X., Zhang Y., Gan S.S. (2012). An ABA regulated and Golgi-localized protein phosphatase controls water loss during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 69, 667–678.

Zhang H., Zhou C. (2013). Signal transduction in leaf senescence. *Plant Molecular Biology* 82, 539-545.

Zhao D., Derkx A.P., Liu D.C., Buchner P., Hawkesford M.J. (2014). Overexpression of a NAC transcription factor delays leaf senescence and increases grain nitrogen concentration in wheat. *Plant Biol (Stuttg)*.

Zimmermann P., Zentgraf U. (2005). The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular & Molecular Biology Letters* 10, 515-534.

Annexes



Genotypic variability of N use efficiency in winter oilseed rape reveals the mechanisms involved in leaf N remobilization associated to sequential senescence in response to nitrate limitation.

Girondé Alexandra¹, Poret Marine¹, Etienne Philippe¹, Trouverie Jacques¹, Bouchereau Alain², Le Cahérec Françoise², Leport Laurent², Nési Nathalie², Avice Jean-Christophe¹.

¹INRA, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutrition NCS, Esplanade de la Paix, F-14032, Caen, France; ²INRA UMR 1349 Institut de Génétique Environnement et Protection des Plantes F-35653 Le Rheu Cedex, France

alexandra.gironde@gmail.com marine.poret@live.fr

This work was funded by ANR (ANR-07-GPLA-016) GENEGERY

Introduction

Oilseed rape (*Brassica napus* L.) is the third worldwide oleaginous crop. It requires high level of nitrogen (N) fertilizer which only 50% is found in seeds (1) revealing a low N Use Efficiency (NUE) mainly related to a low leaf N Remobilization Efficiency (NRE). This is strongly linked to senescence mechanisms involving proteolysis processes due to proteases (2). In order to improve NRE, our goals were to (i) explore the genotypic variability of NRE and (ii) identify mechanisms leading to a better N remobilization during senescence processes.

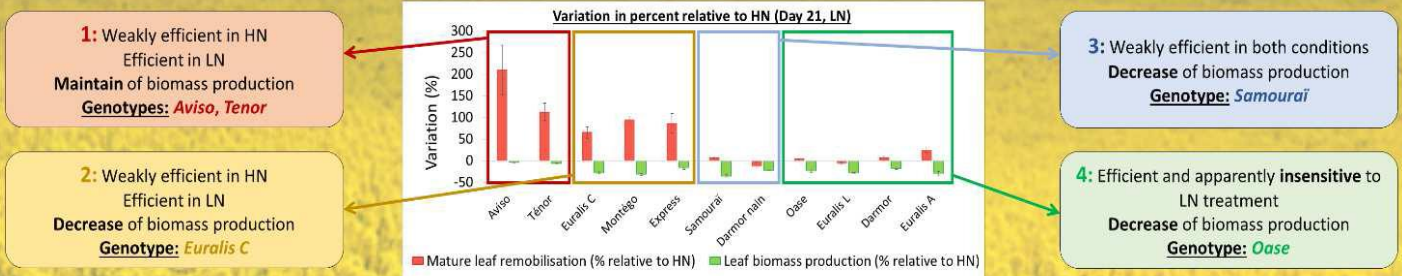
Material and Methods

A screening on 11 genotypes was performed at vegetative stage using a long term pulse-chase ¹⁵N-labeling to determine the N remobilization at whole plant level and in a leaf rank becoming senescent. Plants were supplied with high (HN: 3.75 mM) or low (LN: 0.375 mM) nitrate during 21 d. The theoretical last senescing leaf rank was determined by the SAG12/Cab method (3) and the proteases were identified by: 2-D electrophoresis, immunodetection and tests of RubisCO degradation in gel with specific inhibitors of proteases classes.

Results

1. Genotypic variability of NRE

→ Four responses profiles depending of N remobilization in the mature leaf and the maintain or not of biomass production in LN condition were identified.



1: Weakly efficient in HN
Efficient in LN
Maintain of biomass production
Genotypes: Aviso, Tenor

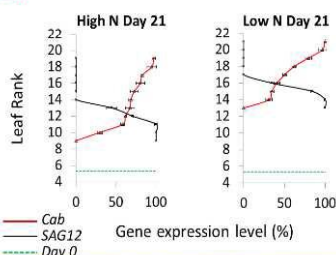
2: Weakly efficient in HN
Efficient in LN
Decrease of biomass production
Genotype: Euralis C

3: Weakly efficient in both conditions
Decrease of biomass production
Genotype: Samourai

4: Efficient and apparently insensitive to LN treatment
Decrease of biomass production
Genotype: Oase

2. Link between senescence and N remobilization Aviso vs Oase

2.A Theoretical last senescing leaf rank: Aviso

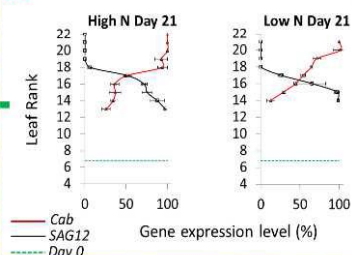


Aviso vs Oase

- Increase of N remobilization
- Increase of senescence speed
- Similar N remobilization
- Similar senescence speed

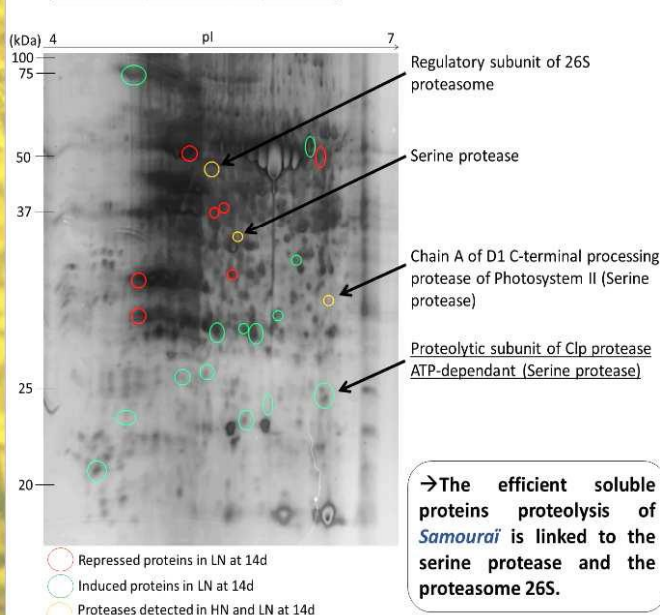
→ An increase of N remobilization contribute to the maintain of biomass production for Aviso and is related to an increase of number of senescing leaves.

2.B Theoretical last senescing leaf rank: Oase

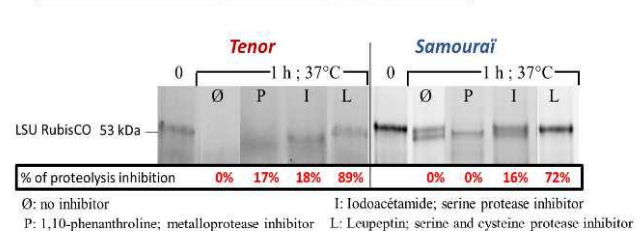


3. During senescence, what are the leaf proteases involved in a good proteolysis in LN for Tenor vs Samourai ?

3.A 2D electrophoresis (Day 14, LN): Samourai

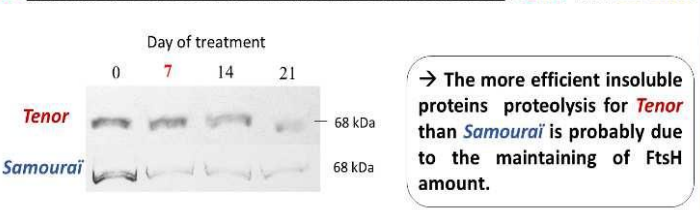


3.B Tests of RubisCO degradation in gel (Day 21, LN): Tenor and Samourai



→ Serine and cystein proteases are involved in the efficient soluble proteins degradation of both genotypes, in addition of the metalloproteases in the case of Tenor.

3.C Immunodetection of the metalloproteases FtsH (LN): Tenor and Samourai



Conclusion

These results highlight the strong link between N remobilization and (i) senescence, (ii) soluble and insoluble proteolysis and (iii) the involvement of serine, cysteine and metalloproteases (as the FtsH) in an efficient proteolysis. Further studies are in progress to precise these results.

Genotypic variability of N use efficiency in winter oilseed rape reveal the proteolysis mechanisms involved in leaf N remobilization associated to sequential senescence in response to nitrate limitation.

Girondé Alexandra¹, Poret Marine¹, Etienne Philippe¹, Trouverie Jacques¹, Bouchereau Alain², Le Cahérec Françoise², Leport Laurent², Nési Nathalie², Avice Jean-Christophe¹.

¹INRA, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutritions NCS, Esplanade de la Paix, F-14032, Caen, France ; ²INRA UMR 1349 Institut de Génétique Environnement et Protection des Plantes F-35653 Le Rheu Cedex, France

marine.poret@live.fr ; alexandra.gironde@gmail.com

Oilseed rape (*Brassica napus* L.) is the third worldwide oleaginous crop and requires high level of nitrogen (N) fertilizer which only 50% is found in seeds [1] revealing a low N Use Efficiency (NUE). This weak NUE is mainly related to a low leaf N Remobilization Efficiency (NRE). In order to improve NRE, our goals were to (i) explore the genotypic variability of NRE and (ii) identify mechanisms leading to a better N remobilization during senescence process.

To achieve these objectives, a screening on 11 genotypes was performed at vegetative stage using a long term pulse-chase ¹⁵N-labeling, to determine the N remobilization at whole plant level and in a leaf rank becoming senescent. Plants were supplied with high (HN: 3.75 mM) or low (LN: 0.375 mM) nitrate during 21 d.

Results indicated that there was 4 profiles of responses to LN conditions depending on N remobilization and biomass production: (1) high NRE in both N conditions without maintaining of growth, (2) low NRE in both N conditions without a maintain of growth, (3) high NRE in LN nutrition without a maintain of leaf growth, or (4) with a maintain of growth. Based on these data, the N remobilization during the senescence of a leaf becoming senescent was specifically investigated in 2 contrasted genotypes: Samourai (profile 2) and Ténor (profile 4). Both genotypes had the same rate of soluble proteins degradation after 21 d but Ténor presented a higher decrease of total proteins amount. This indicates that the higher NRE of Ténor in response to LN is mainly due to an efficient proteolysis of soluble and insoluble proteins, while Samourai does not degrade so much the insoluble ones. Moreover, western blotting suggests an important role of the FtsH in the proteolysis mechanisms involved in the efficient NRE of Ténor, and studies of proteases activities highlighted the importance of serine and cysteine proteases in both genotypes. The characterization of proteases especially involved in high NRE is in progress.

[1] Schjoerring J.K., Bock J.G.H., Gammelvind L., Jensen C.R. and Mogensen V.O. Nitrogen incorporation and remobilization in different shoot components of field-grown winter oilseed rape as affected by rate of nitrogen application and irrigation. *Plant Soil* 177 (1995) 255-264.

Characterization of senescence-associated proteases activities related to N leaf remobilization of winter oilseed rape at the vegetative stage

M. Poret¹, B. Chandrasekar^{2,3}, R.A.L. Van der Hoorn², J.C. Avicé¹

¹UCBN, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutrition N.C.S., F-14032 Caen, France; ²The Plant Chemetics laboratory, Department of Plant Sciences, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3RB, United Kingdom; ³The Plant Chemetics Laboratory, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Carl-von-Linne Weg 10, 50829 Cologne, Germany. This work was funded by the Program Investissement AVENIR - RAPSODYN (Optimisation of the RAPeSeed Oil content and Yield under low Nitrogen input).



1. Context and Objectives

Oilseed rape (*Brassica napus* L.) is a crop plant with a high need of nitrogen fertilizers (140-200 kg N ha⁻¹ year⁻¹). Nevertheless, this crop is characterized by a weak N Use Efficiency (NUE) mainly due to a low leaf N Remobilization Efficiency (NRE) during the sequential senescence at the vegetative stage [1]. To characterize the key mechanisms able to improve the NUE, the objective was to identify senescence-associated proteases activities implied in the proteins degradation leading to an efficient N remobilization during leaf senescence.

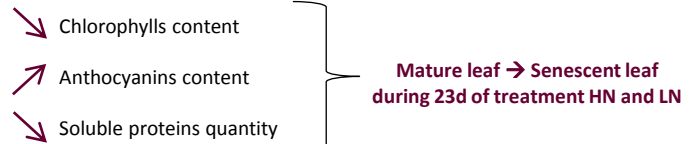
2. Materials and Methods

I. Leaf senescence processes:

Plants were cultivated during 23 days at the vegetative stage in greenhouse under limiting or ample nitrate supply (0.375 (LN) vs 3.75 mM (HN)). Leaf senescence processes of a mature leaf becoming senescent were investigated:



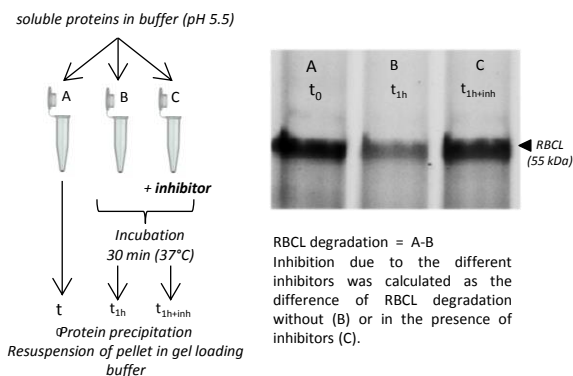
3. Results



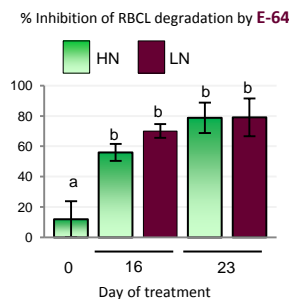
II. Characterization of protease activities associated to senescence by two different methods:

a. In gely analysis of the RuBisCO (RBCL) degradation with or without inhibitors of specific proteases classes

Step 1: sample preparation Step 2: 1-D electrophoresis



Example: Papain-like cys proteases (PLCPs) activities at pH 5.5



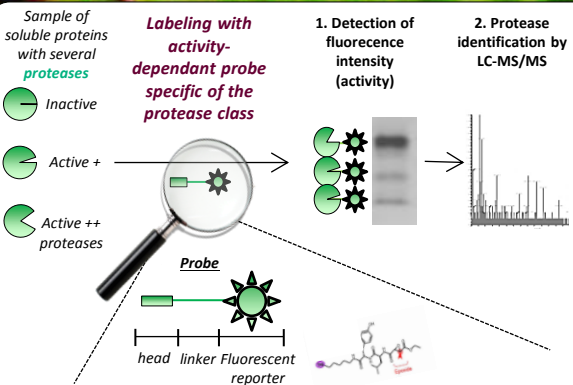
→ Increase of E64 Inhibition of RBCL degradation : Increase of PLCPs activities against RBC during senescence

Using the same method (pH 5.5):

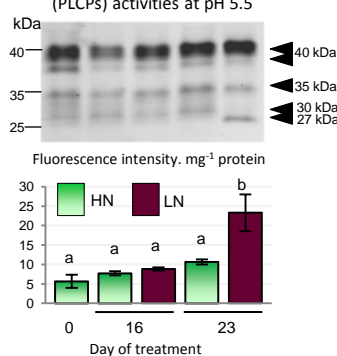
→ Increase of Vacuolar processing enzymes (VPEs) activities against RBCL (inhibitor YVAD)

→ Maintain of aspartic and serine proteases activities against RBCL (inhibitor pepstatin A and aprotinin respectively)

b. Protease activity profiling using activity-based probes specific of proteases classes



Example: Papain-like cys proteases (PLCPs) activities at pH 5.5



→ Increase and apparition of several PLCPs activities during leaf senescence are observed in response to N limitation (Identification of several PLCPs)

Using the same method:

→ Increase and apparition of several VPEs activities (pH 5.5; limitation of N); correlation with the increase of PLCPs activities

→ Increase of serine proteases and β1 + β2 sub-units of the proteasome activities (pH 7.5 limitation of N)

4. Conclusion and perspectives

This study showed that: (1) aspartic proteases were active regardless of N supply and (2) serine proteases, proteasome and particularly cysteine proteases (PLCPs and VPEs) activities were increased when senescence processes were amplified by a limitation of nitrate. As soluble proteins degradation in senescing leaves of oilseed rape is crucial for the improvement of N remobilization [2], the characterization of proteases activities is a key for the comprehension of N remobilization. Investigations of genotype variability were in progress in order to better characterize the proteases activities associated with a high N leaf remobilization efficiency.

Characterization of senescence-associated proteases activities related to N leaf remobilization of winter oilseed rape at the vegetative stage

M. Poret¹, B. Chandrasekar^{2,3}, R. A. L. Van der Hoorn², J. C. Avicé¹

¹ UCBN, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutrition N.C.S., F-14032 Caen, France ; ² The Plant Chemetics laboratory, Department of Plant Sciences, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3RB, United Kingdom ; ³ The Plant Chemetics Laboratory, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Carl-von-Linne Weg 10, 50829 Cologne, Germany.

marine.poret@unicaen.fr

Background: Oilseed rape (*Brassica napus* L.) is a crop plant characterized by a weak N use efficiency (NUE) mainly due to a low N Remobilization Efficiency (NRE) during the sequential leaf senescence at vegetative stage [1].

Objectives: To characterize the key mechanisms able to improve the NUE of oilseed rape, the objective was to identify senescence-associated proteases activities implied in N remobilization during leaf senescence.

Methods: Plants were cultivated at the vegetative stage in greenhouse under limiting or ample nitrate supply (0.375 mM, LN; 3.75 mM, HN). We investigated leaf senescence processes (chlorophyll and anthocyanin contents; soluble proteins quantity) and proteases activities of a mature leaf becoming senescent during the experiment. The characterization of proteases activities was performed firstly by using *in gely* analysis of the RuBisCO (RBCL) degradation with or without inhibitors of specific proteases classes. Then, to determine which proteases are responsible of the RBCL degradation, we performed standard protease activity profiling using activity-dependent probes specific of proteases classes.

Results: As expected, the mature leaf became senescent regardless of the nitrate treatment but LN conditions amplified senescence processes associated with a high degradation of soluble proteins. Then, characterization of proteases activities showed that: (1) aspartic proteases were active during senescence regardless of nitrate supply and (2) serine proteases, proteasome and particularly cysteine proteases (Papain-like cys proteases PLCPs and vacuolar processing enzymes VPEs) activities were increased when senescence processes were amplified by a LN supply. Moreover, three PLCPs were identified as playing a key role during leaf senescence. Furthermore, it was suggested that VPEs proteases might be responsible of the activation of some PLCPs.

Conclusions: As soluble proteins degradation in senescing leaves of oilseed rape is crucial for the improvement of N remobilization, characterization of proteases activities is a key for comprehension of N remobilization. Moreover, the NRE genotypic differences in LN conditions observed by Girondé *et al.* [2] might be associated to different or contrasted proteases activities during senescence. Investigations of genotype variability were in progress in order to better characterize the proteases activities associated with a high N leaf remobilization efficiency.

[1] Malagoli P., Lainé P., Rossato L., Ourry A. Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to harvest. I. Global N flows between vegetative and reproductive tissues in relation to leaf fall and their residual N. *Annals of Botany*. 95 (2005) 853-861.

[2] Girondé A., Poret M., Etienne P., Trouverie J., Bouchereau A., Le Cahérec F., Lepoort L., Orsel M., Niogret M. F., Deleu C., Avicé J. C. A profiling approach of the natural variability of foliar N remobilization at the rosette stage gives clues to understand the limiting processes involved in the low N use efficiency of winter oilseed rape. *Journal of Experimental Botany* 66 (2015a) 2461-2473.

Keywords: Oilseed rape, Nitrogen remobilization, senescence, senescence-associated proteases SAPs.

ABPP: a relevant proteomic method to characterize protease activities involved in the genotypic variability of protein remobilization during leaf senescence of winter oilseed rape

Marine Poret^{1, 2, 3}, Balakumaran Chandrasekar^{4, 5}, Renier A. L. van der Hoorn⁴, Jean-Christophe Avice^{1, 2, 3}.

¹Université de Caen Normandie, F-14032 Caen, France ; ²UCBN, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France, F-14032 Caen, France ; ³INRA, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France ; ⁴The Plant Chemetics Laboratory, Department of Plant Sciences, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3RB, United Kingdom ; ⁵The Plant Chemetics Laboratory, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Carl-von-Linne Weg 10, 50829 Cologne, Germany.

Marine.poret@unicaen.fr

Oilseed rape (*Brassica napus* L.) is a crop plant characterized by a weak Nitrogen Use Efficiency (NUE) mainly due to a low Nitrogen Remobilization Efficiency (NRE) during the sequential leaf senescence at vegetative stage. To characterize the key mechanisms able to improve NRE, our goal was to identify protease activities implied in an efficient protein remobilization during leaf senescence.

To reach this goal, plants of three genotypes with contrasted NRE were cultivated at the vegetative stage in greenhouse under limiting or ample nitrate supply (0.375 mM, LN; 3.75 mM, HN). Leaf senescence processes (chlorophylls and soluble proteins) were investigated of a mature leaf becoming senescent during the experiment. Then, to characterize proteases activities, an activity-based protein profiling (ABPP) was performed using activity-dependent probes specific of protease classes.

As expected, the mature leaf became senescent regardless of the N treatment and LN conditions amplified senescence processes associated with a high degradation of soluble proteins. However, the protein degradation was higher for the genotypes G1 and G2, characterized by an efficient NRE under LN condition [1] compared to genotype G3 characterized by a weak NRE under LN condition. The highest protein degradation is strongly related to the increase and the apparition of cysteine proteases activities under LN supply, particularly for G1 and G2 compared to G3. Indeed, the activity of several Papain-like cysteine proteases belonging to RD21 and SAG12-like proteins appeared after 23 days of LN treatment for G1 and G2 but not for G3.

In conclusion, the NRE genotypic differences in LN conditions could be associated with contrasted proteases activities during senescence. Moreover, the characterization of protease activities by using these probes is a reliable method in oilseed rape which could allow the investigation of NRE genotypic variability in larger scale.

[1] Girondé A., Poret M., Etienne P., Trouverie J., Bouchereau A., Le Cahérec F., Leport L., Orsel M., Niogret M. F., Deleu C., Avice J. C. A profiling approach of the natural variability of foliar N remobilization at the rosette stage gives clues to understand the limiting processes involved in the low N use efficiency of winter oilseed rape. *Journal of Experimental Botany* 66 (2015) 2461-2473.

Senescence-associated protease activities reveal the genotypic variability of protein degradation efficiency in leaf of *Brassica napus* L.

M. Poret¹, B. Chandrasekar^{2,3}, R.A.L. Van der Hoorn², J.C. Avicé¹

¹UCBN, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutrition N.C.S., F-14032 Caen, France ; ²The Plant Chemetics laboratory, Department of Plant Sciences, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3RB, United Kingdom ; ³The Plant Chemetics Laboratory, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Carl-von-Linne Weg 10, 50829 Cologne, Germany. This work was funded by the Program Investissement Avenir - RAPSODYN (Optimisation of the RApSeed Oil content and Yield under low Nitrogen input).

marine.poret@unicaen.fr

1. Context and Objectives

Oilseed rape (*Brassica napus* L.) is a crop plant with a high need of nitrogen fertilizers (140-200 kg N ha⁻¹ year⁻¹). Nevertheless, this crop is characterized by a low N Use Efficiency (NUE) mainly due to a weak leaf N Remobilization Efficiency (NRE) during the sequential leaf senescence at the vegetative stage [1]. To characterize the key mechanisms able to improve the NUE, the objective was to identify the senescence-associated protease activities implied in the protein degradation leading to an efficient N remobilization during leaf senescence.

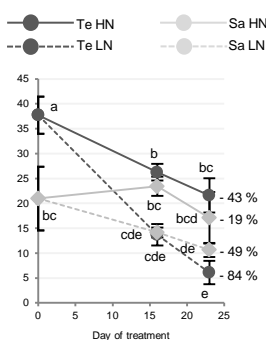
2. Materials and Methods

Two genotypes with contrasted NRE [2] (Tenor and Samourai) were cultivated at the vegetative stage in greenhouse under limiting or ample nitrate supply (Low N: 0.375 mM (LN) or High N: 3.75 mM (HN)). We studied protein degradation and performed Activity-based Protein Profiling (ABPP) [3] to characterize protease activities firstly on a mature leaf during the sequential senescence and secondly during the senescence of cotyledons.

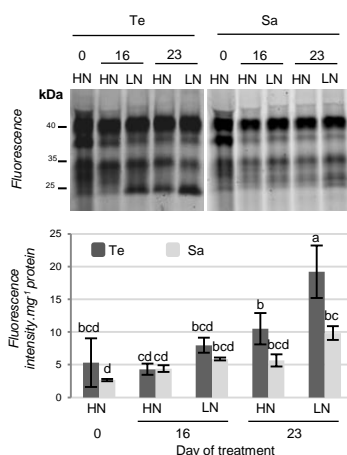
3. Results

3.1. Cysteine protease activities for Tenor and Samourai during the sequential senescence

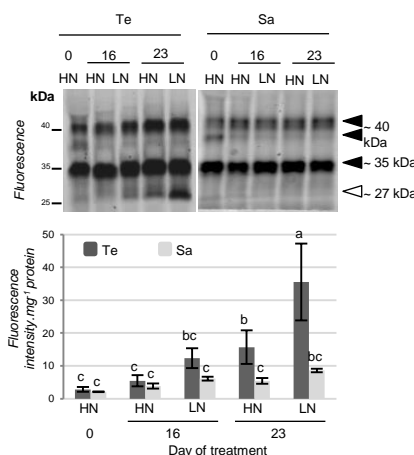
A. Quantity of soluble proteins (mg/Laminae)



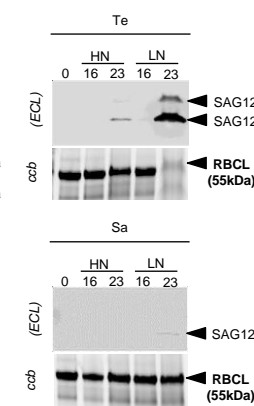
B. Papain-like cystein proteases (MV201 probe)



C. Aleurain-like proteases (FY01 probe)



D. Immunodetection of SAG12



→ Protein degradation between D0-D23:

Tenor efficient NRE under LN condition

Samourai weak NRE under LN condition

→ Cysteine protease activities are induced during leaf senescence after 23 days of LN treatment and:

Tenor PLCP activities
AALP activities
Protein SAG12

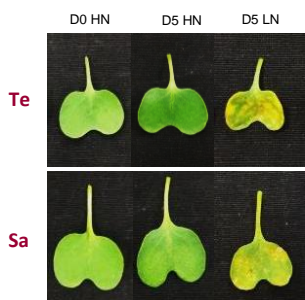
Samourai

→ Genotypic differences of cysteine protease activities:

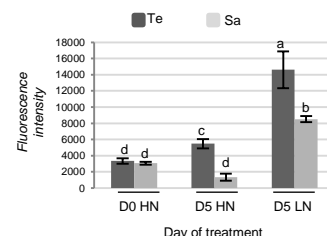
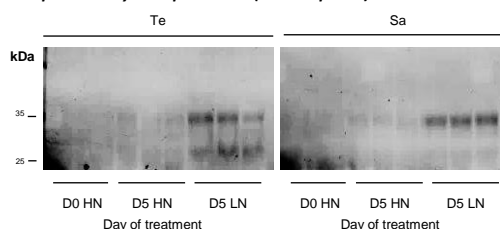
Tenor
New activity of PLCPs and Aleurain-like proteases at ~ 27 kDa which can correspond to RD21-like, SAG12-like, AALP-like and XBPC3-like proteases [4]

3.2 Cysteine protease activities for Tenor and Samourai during the senescence of cotyledons

A. Cotyledons of Te and Sa after 0 or 5 days of treatment HN or LN



B. Papain-like cystein proteases (MV201 probe)



→ PLCP activities are induced during the senescence of cotyledons after 5 days of LN treatment and:

Tenor PLCP activities

Samourai

→ Genotypic differences of PLCP activities:

Tenor
New activity of PLCPs at ~ 27 kDa

4. Conclusion and perspectives

As soluble proteins degradation in senescing leaves of oilseed rape is crucial for the improvement of N remobilization [2], the characterization of proteases activities is a key for the comprehension of N remobilization. We observed that the NRE genotypic differences in LN conditions could be associated with contrasted cysteine protease activities during senescence. Moreover, this genotypic variability of cysteine protease activities observed during leaf senescence at the vegetative stage is also observed precociously during the senescence of cotyledons. In conclusion, using ABPP on cotyledons seem to be a reliable method in oilseed rape to investigate NRE genotypic variability precociously in larger scale.

Senescence-associated protease activities reveal the genotypic variability of protein degradation efficiency in leaf of *Brassica napus* L.

Marine Poret¹, Balakumaran Chandrasekar ^{2,3}, Renier A. L. van der Hoorn^{2,3}, Jean-Christophe Avice¹

¹UCBN, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutrition N.C.S., F-14032 Caen, France; ²The Plant Chemetics laboratory, Department of Plant Sciences, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3RB, United Kingdom; ³The Plant Chemetics Laboratory, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Carl-von-Linne Weg 10, 50829 Cologne, Germany.

Marine.poret@unicaen.fr

Oilseed rape (*Brassica napus* L.) is a crop plant characterized by a weak Nitrogen (N) use efficiency (NUE) mainly due to a low N Remobilization Efficiency (NRE) during the sequential leaf senescence at vegetative stage [1]. To characterize the key mechanisms able to improve the NUE, the objective was to identify the senescence-associated protease activities implied in the proteins degradation leading to an efficient N remobilization during leaf senescence. To reach this goal, two genotypes with contrasted NRE [2] (Ténor and Samouraï) were cultivated at the vegetative stage in greenhouse under limiting or ample nitrate supply (0.375 mM, LN; 3.75 mM, HN). We observed that the protein degradation was higher for Ténor characterized by an efficient NRE under LN condition compared to Samouraï characterized by a weak NRE under LN condition. Activity-based Protein Profiling (ABPP) [3] revealed that the highest protein degradation for Ténor is strongly related to the increase and the apparition of cysteine proteases activities under LN supply compared to Samouraï. This indicates that the NRE genotypic differences in LN conditions could be associated with contrasted protease activities during senescence. Moreover, this genotypic variability of cysteine protease activities observed during leaf senescence at the vegetative stage is also observed precociously during the senescence of cotyledons. In conclusion, ABPP on cotyledons seem to be a reliable and rapid method to investigate NRE genotypic variability in oilseed rape.

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

[2] Girondé A., Poret M., Etienne P., Trouverie J., Bouchereau A., Le Cahérec F., Leport L., Orsel M., Niogret M. F., Deleu C., Avice J.C. A profiling approach of the natural variability of foliar N remobilization at the rosette stage gives clues to understand the limiting processes involved in the low N use efficiency of winter oilseed rape. Journal of Experimental Botany. 66 (2015) 2461-2473.

[3] Morimoto K., Van der Hoorn R.A.L. The increasing impact of activity-based protein profiling in plant science. Plant Cell Physiology. 0 (2016) 1-16.

Proteases activities and phytohormones patterns related to efficient leaf nitrogen remobilization during senescence of *Brassica napus* L.

Marine Poret¹, Balakumaran Chandrasekar^{2,3}, Sylvain Déchaumet⁴, Alain Bouchereau⁴, Tae-Hwan Kim^{1,5}, Bok-Rye Lee^{1,5}, Renier A. L. van der Hoorn², Jean-Christophe Avice¹

¹ INRA, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutrition N.C.S., F-14032 Caen, France. ² The Plant Chemetics Laboratory, Department of Plant Sciences, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3RB, United Kingdom. ⁴ INRA, UMR 1349 Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, INRA, Agrocampus Ouest, Université de Rennes 1, F-35653 Le Rheu, France. ⁵ Department of Animal Science, Institute of Agricultural Science and Technology, College of Agriculture and Life Science, Chonnam National University, Gwangju, South Korea. This work was funded by the Program Investissement Avenir - RAPSODYN (Optimisation of the RAPeSeed Oil content and Yield under low Nitrogen input) and PHC STAR 36668W (Programme Hubert Curien Franco-Korean).



marine.poret@unicaen.fr

1. Context and Objectives

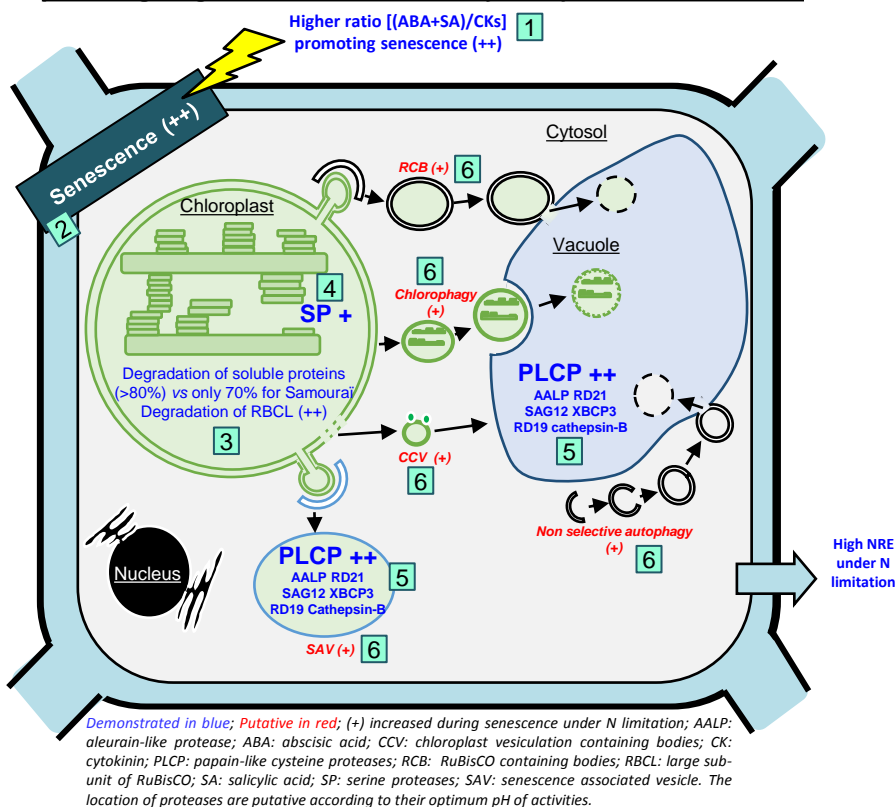
Oilseed rape (*Brassica napus* L.) is an oleoproteaginous crop characterized by a weak Nitrogen Use Efficiency (NUE) mainly due to a low N Remobilization Efficiency (NRE) during leaf senescence at vegetative stages [1-3]. In order to characterize the physiological and molecular determinants related to an high NRE, the objective was to identify (i) the protease activities involved in an efficient N recycling during leaf senescence and (ii) the putative phytohormonal balance able to induce proteolysis.

2. Materials and Methods

To reach this goal, changes in protease activities (using activity-based protein profiling method [4]) and phytohormone contents were investigated in a mature leaf becoming senescent of two genotypes with contrasted NRE [2] cultivated at the vegetative stage under greenhouse conditions with low (LN) or high (HN) nitrate supply.

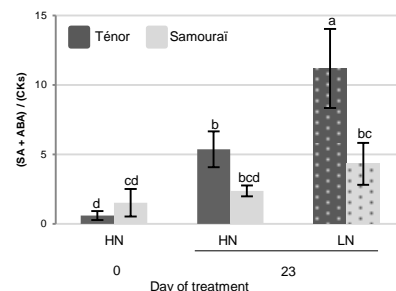
3. Results

Schematic representation of physiological and proteolysis changes in cells associated with the sequential leaf senescence in a genotype (Ténor) presenting a high N remobilization efficiency in response to an N limitation

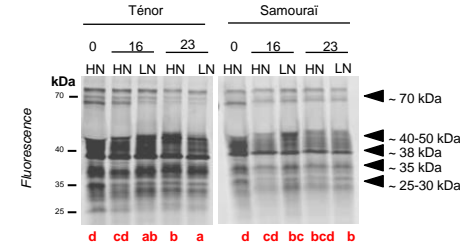


- (A) The genotype Ténor characterized by the higher NRE presented enhanced senescence processes in response to a N limitation which could be related to an higher hormonal ratio ([salicylic acid] + [abscisic acid]) / ([cytokinins]) promoting senescence. (1-2)
- (B) Ténor was also characterized by a stronger proteolysis compared to Samourai (3). This efficient proteolysis was highly related to the increase of serine (4) and cysteine protease activities (5) and the apparition of new cysteine protease activities (RD21, RD19, SAG12, XBPC3, AALP, cathepsin-B) during senescence induced by N limitation.
- (C) These strong protease activities may be correlated to the higher hormonal ratio enhancing senescence during senescence particularly under low N supply.
- (D) Finally, the high NRE of Ténor could be associated to high proteolysis processes and maybe the induction of vesicular traffic allowing the transport of proteins (as RuBisCO) towards sites of proteolysis containing proteases as PLCPs (6).

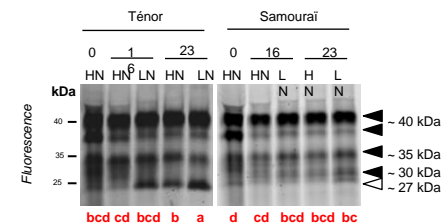
1 Genotypic differences of phytohormonal ratio:



4 Genotypic differences SPs activities (Detection of active protease by fluorescent activity-based probe FP-Rh):



5 Genotypic differences PLCPs activities (Detection of active proteases by fluorescent activity-based probe MV201):



△ New activities at ~ 27 kDa: 3 different RD21-like proteases, 2 cathepsin-B proteases, 2 SAG12-like proteases, 1 RD19-like protease, 2 XBPC3-like proteases and 1 AALP.

4. Conclusion and perspectives

As soluble proteins degradation in senescing leaves of oilseed rape is crucial for the improvement of N remobilization [1-3], the characterization of proteases activities is a key for the comprehension of N remobilization. We observed that the NRE genotypic differences in LN conditions could be associated with contrasted protease activities during senescence and specific hormonal ratio. To improve the NUE of oilseed rape via the optimization of NRE, this study suggests that it will be necessary to explore the genotypic variability of oilseed rape in order to select genotypes presenting high protease activities during leaf sequential senescence and PLCPs activities seem to be good targets to distinguish genotypes with contrasted NRE.

Proteases activities and phytohormones patterns related to efficient leaf nitrogen remobilization during senescence of *Brassica napus* L.

Marine Poret¹, Balakumaran Chandrasekar^{2,3}, Sylvain Déchaumet⁴, Alain Bouchereau⁴, Tae-Hwan Kim^{1,5}, Bok-Rye Lee^{1,5}, Renier A. L. van der Hoorn², Jean-Christophe Avice¹

¹ INRA, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France. ² The Plant Chemetics Laboratory, Department of Plant Sciences, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3RB, United Kingdom. ³ The Plant Chemetics Laboratory, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Carl-von-Linne Weg 10, 50829 Cologne, Germany. ⁴INRA, UMR 1349 Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, INRA, Agrocampus Ouest, Université de Rennes 1, F-35653 Le Rheu, France. ⁵ Department of Animal Science, Institute of Agricultural Science and Technology, College of Agriculture and Life Science, Chonnam National University, Gwangju, South Korea.

Marine.poret@unicaen.fr

Oilseed rape (*Brassica napus* L.) is an oleoproteaginous crop characterized by a weak Nitrogen Use Efficiency (NUE) mainly due to a low N Remobilization Efficiency (NRE) during leaf senescence at vegetative stages [1]. In order to characterize the physiological and molecular determinants related to an high NRE, the objective was to identify (i) the protease activities involved in an efficient N recycling during leaf senescence and (ii) the putative phytohormonal balance able to stimulate the level of proteolysis. To reach this goal, changes in protease activities (using activity-based protein profiling method) and phytohormone contents were investigated in a mature leaf becoming senescent of two genotypes with contrasted NRE [2] cultivated at the vegetative stage under greenhouse conditions with low or high nitrate supply. Results revealed that the genotype with the higher NRE presented an enhanced senescence processes in response to a limitation of nitrate as well as a stronger degradation of soluble proteins compared to the other genotype. This efficient proteolysis was highly related to (i) the increase of serine and cysteine proteases activities and (ii) the apparition of new cysteine proteases activities during senescence induced by a nitrate limitation. Moreover, this genotype was characterized by an higher hormonal ratio ([salicylic acid] + [abscisic acid]) / ([cytokinins]) enhancing senescence which may be correlated to the stronger protein degradation and serine/cysteine proteases activities during senescence particularly under low N supply.

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

[2] Girondé A., Poret M., Etienne P., Trouverie J., Bouchereau A., Le Cahérec F., Leport L., Orsel M., Niogret M. F., Deleu C., Avice J.C. A profiling approach of the natural variability of foliar N remobilization at the rosette stage gives clues to understand the limiting processes involved in the low N use efficiency of winter oilseed rape. Journal of Experimental Botany. 66 (2015) 2461-2473.

PORET Marine

Thèse de l'Université de Caen Normandie au sein de l'École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (Spécialité : Sciences agronomiques, Biotechnologies agro-alimentaires).
UMR INRA-UCN 950 EVA (Écophysiologie Végétale Agronomie et nutrition N, C, S).

Titre : Caractérisation de la machinerie protéolytique associée à une remobilisation efficiente de l'azote pendant la sénescence dans le but d'optimiser l'efficacité d'usage de l'azote chez le colza (*Brassica napus* L.)

Résumé : Le colza est une oléoprotéagineuse exigeante en azote (N), présentant une faible efficacité d'usage du N (EUA). Le défi majeur vise à améliorer le bilan agro-environnemental du colza par le biais d'une optimisation de l'EUA qui permettra un maintien voire une augmentation du rendement en réponse à une réduction des intrants azotés. Lors des stades végétatifs ou reproducteurs, l'EUA est limitée par une faible efficacité de remobilisation du N (ERA) lors de la sénescence des feuilles ou des siliques. Les protéines correspondant à la principale forme de réserve de composés N remobilisables, l'objectif était de caractériser la machinerie protéolytique (identification et régulation des protéases actives) qui est associée à une remobilisation efficace du N lors de ces deux types de sénescence en conditions de limitation en nitrate.

Au stade rosette, le génotype présentant une meilleure ERA était caractérisé par un ratio (acide salicylique + acide abscissique / cytokinines) élevé qui est parallèle à une accélération de la sénescence et à une plus forte dégradation des protéines solubles. Ainsi, une augmentation des activités des protéases à sérine et à cystéine et l'induction de l'activité de nouvelles protéases à cystéine (RD21, SAG12, AALP, RD19, XBCP3 et cathepsine-B) sont observées lors de la sénescence en réponse à une limitation en N. Ces différences génotypiques d'activités protéasiques sont détectables très précocement lors de la sénescence des cotylédons qui semble également être un bon modèle pour étudier la régulation de la protéolyse lors de la sénescence. Ce modèle a permis de vérifier l'implication des phytohormones dans la régulation des activités protéasiques. En parallèle, des protéases actives SAG12, RD21 et AALPs ont également été identifiées comme essentielles lors de la sénescence des péricarpes et leur implication dans la variabilité génotypique de l'ERA lors du remplissage des graines est postulée.

Mots clés : Physiologie végétale, Plantes – Azote, Colza, Sénescence, Remobilisation, Feuilles, Siliques, Cotylédon, Protéomique, Protéases, Activité, Phytohormones

Title: Characterization of proteolytic machinery associated to an efficient remobilization of nitrogen during senescence in order to improve the nitrogen use efficiency of oilseed rape (*Brassica napus* L.).

Abstract: Oilseed rape is an oleoproteaginous crop with high nitrogen (N) demanding and characterized by a low N use efficiency (NUE). The main challenge to improve the agri-environmental balance of oilseed rape is to optimize NUE allowing a sustainable yield despite a reduction of N inputs. During vegetative or reproductive stages, EUA is limited by a low N remobilization efficiency (NRE) during leaf or pod senescence. As proteins correspond to the largest storage of N compounds that could be remobilized, the objective was to characterize the proteolytic machinery (identification and regulation of proteases) that is associated with efficient N remobilization in these two types of senescence in N limiting conditions.

At rosette stage, the genotype with better NRE was characterized by an elevated (salicylic acid + abscisic acid / cytokinins) ratio that is parallel with the enhancement of senescence and higher protein degradation. Thus increased activity of serine and cysteine proteases and the induction of new cysteine protease activities (RD21, SAG12, AALP, RD19, XBCP3 and cathepsin-B) are observed during senescence in response to N limitation. These genotypic differences of protease activities are detectable during the senescence of cotyledons which also appeared to be a good model to study the senescence regulation. This model was used to validate the involvement of the hormones in the regulation of protease activities. In parallel, active proteases SAG12, RD21 and AALPs were also identified as essential during senescence of pericarps and their involvement in the genotypic variability of ERA during seed filling is postulated.

Key words: Plant physiology, Crops – Nitrogen, Oilseed rape, Senescence, Remobilization, Leaf, Pods, Cotyledon, Proteomic, Protease, Activity, Phytohormones
