



HAL
open science

Dissection métabolique de la sénescence foliaire et de la remobilisation des nutriments chez le colza (*Brassica napus*)

Sylvain Dechaumet

► **To cite this version:**

Sylvain Dechaumet. Dissection métabolique de la sénescence foliaire et de la remobilisation des nutriments chez le colza (*Brassica napus*). Biologie végétale. Agrocampus Ouest, 2018. Français. NNT : 2018NSARC133 . tel-01893095

HAL Id: tel-01893095

<https://theses.hal.science/tel-01893095>

Submitted on 11 Oct 2018

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

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

AGRO CAMPUS

OUEST

Sylvain DECHAUMET • 18 mai 2018

Thèse AGROCAMPUS OUEST
sous le label de l'Université de Bretagne Loire
pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'AGROCAMPUS OUEST
Spécialité Biologie et physiologie végétales

ÉCOLE DOCTORALE • Écologie, Géosciences, Agronomie
et Alimentation (EGAAL)

LABORATOIRE D'ACCUEIL • UMR INRA / AGROCAMPUS OUEST /
Université de Rennes 1, Institut de génétique, environnement et
protection des plantes (IGEPP)

Dissection métabolique de la sénescence foliaire et de la remobilisation des nutriments chez le colza (*BRASSICA NAPUS L.*)

Maria MANZANARES-DAULEUX

Professeure, AGROCAMPUS OUEST, UMR INRA-AO-UR1 IGEPP /
présidente

Anne KRAPP

Directrice de recherche, INRA Versailles / *rapporteuse*

Dominique ROLIN

Professeur, Université Bordeaux / *rapporteur*

Anne-Emmanuelle HAY-DE BETTIGNIES

Maître de conférences, Université Lyon / *examinatrice*

Yann GUITTON

PhD, ONRIS Nantes / *examineur*

Alain OURRY

Professeur, Université de Caen / *examineur*

Alain BOUCHEREAU

Professeur, Université Rennes1 / *directeur de thèse*

AGRO CAMPUS

OUEST

Sylvain DECHAUMET • 18 mai 2018

Thèse AGROCAMPUS OUEST
sous le label de l'Université de Bretagne Loire
pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'AGROCAMPUS OUEST
Spécialité Biologie et physiologie végétales

ÉCOLE DOCTORALE • Écologie, Géosciences, Agronomie
et Alimentation (EGAAL)

LABORATOIRE D'ACCUEIL • UMR INRA / AGROCAMPUS OUEST /
Université de Rennes 1, Institut de génétique, environnement et
protection des plantes (IGEPP)

Dissection métabolique de la sénescence foliaire et de la remobilisation des nutriments chez le colza (*BRASSICA NAPUS L.*)

Maria MANZANARES-DAULEUX

Professeure, AGROCAMPUS OUEST, UMR INRA-AO-UR1 IGEPP /
présidente

Anne KRAPP

Directrice de recherche, INRA Versailles / *rapporteuse*

Dominique ROLIN

Professeur, Université Bordeaux / *rapporteur*

Anne-Emmanuelle HAY-DE BETTIGNIES

Maître de conférences, Université Lyon / *examinatrice*

Yann GUITTON

PhD, ONRIS Nantes / *examineur*

Alain OURRY

Professeur, Université de Caen / *examineur*

Alain BOUCHEREAU

Professeur, Université Rennes1 / *directeur de thèse*

“Joygret: The joy of optimisation combined with the regret of past inefficiencies.”

Hilary Parker

REMERCIEMENTS

Je souhaite commencer par remercier les directeurs de l'UMR1349 INRA - Agrocampus Ouest - Universités de Rennes 1, **Denis Tagu** puis **Maria Manzanares Dauleux** pour fournir aux équipes de recherche ainsi qu'aux doctorants, une structure de recherche performante et conviviale. L'UMR dispose d'une gestion et de nombreux groupes transversaux qui facilitent largement les démarches et les activités de recherches des doctorants. Je vous suis extrêmement reconnaissant, pour développer et maintenir ce cadre professionnel des plus agréables.

Mes remerciements vont également aux membres de mon jury de thèse. Je suis très honoré que la **Dir. Anne Krapp** ainsi que le **Pr. Dominique Rolin** aient accepté d'être les rapporteurs de ces travaux. Je remercie également le **Pr. Alain Ourry**, le **Dr. Yann Guitton**, la **Dr. Anne-Emmanuelle Hay de Bettignies** et la **Pr. Maria Manzanares Dauleux** d'avoir accepté d'être examinateurs de ce travail.

Je remercie sincèrement les membres de mon comité de thèse, **Jean-Christophe Avice**, **Sylvie Dinant**, **Martine Dieuaide** ainsi que mon tuteur **Joël Boustie** pour vos précieux conseils et pour avoir apporté un regard nouveau sur mes travaux.

Il est temps à présent de remercier mon directeur de thèse, **Alain Bouchereau**, sans qui ces travaux n'auraient jamais vu le jour. Merci Alain d'avoir cru en moi depuis mon stage de Master 2 et de m'avoir guidé jusque là. Un grand merci pour m'avoir soutenu dans mes projets de recherche, mes envies d'enseignement et d'encadrement souvent déraisonnables, mon investissement dans le RFMF Junior et pour m'avoir encouragé à suivre des formations. Tu as su me fournir un environnement propice à l'apprentissage et au développement de mon autonomie tout en me motivant à aller toujours plus loin. Je te remercie également pour m'avoir poussé à présenter mes travaux dans de nombreuses situations (réunions, colloques, journées scientifiques, rassemblements, etc.). Ces trois années ont été extrêmement enrichissantes d'un point de vue personnel aussi bien que professionnel et je te dois beaucoup.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à mes collaborateurs : **Bruno Le Bizec**, **Yann Guitton** et **Antoine Escourroux** pour m'avoir accueilli chaleureusement au sein du Laberca. Vous m'avez appris les secrets de la spectrométrie de masse à haute résolution et répondu à mes nombreuses questions. La découverte d'un environnement comme le Laberca a été vraiment révélatrice pour moi et j'ai énormément apprécié l'efficacité et le déroulement de cette collaboration. **Jean-Christophe Avice** et **Marine Poret**, notre collaboration pour les expériences de Marine comme pour celles de Genergy s'est déroulée dans des conditions suboptimales. J'ai énormément apprécié nos échanges, avec des

projets et des propositions qui vont toujours dans les deux sens. Vous mettez en avant le partage et collaborer avec vous fut un réel plaisir.

Je remercie les chercheurs de l'équipe pour leur accueil et nos échanges constructifs et plus particulièrement **Marie-Françoise Niogret, Françoise Le Caherec** et **Nathalie Nesi**. Je vous remercie autant pour votre soutien dans l'encadrement de mes chers stagiaires, nos projets communs que pour nos discussions autour de mes travaux. Votre aide m'a été précieuse et votre accessibilité a largement facilité mes travaux et réflexions.

Un grand merci au corps enseignant de Physiologie végétale de l'Université de Rennes 1, **Alain Bouchereau, Laurent Leport, Antoine Gravot, Carole Deleu, Francisco Cabello Hurtado, Marie-Françoise Niogret** et **Ivan Couée**, pour m'avoir confié des étudiants de licence et de master pendant deux années. J'ai énormément apprécié le contact avec les étudiants et mon premier cours restera une expérience inoubliable. Merci à **Véronique Sauzière** pour son aide et sa disponibilité pendant les séances de travaux pratiques, je ne sais pas comment les étudiants (et les enseignants) feraient sans toi.

Je tiens à remercier mes collègues de P2M2 et plus particulièrement **Solenne Berardocco, Nathalie Marnet** et **Catherine Jonard**. Solenne tu as été la première personne à m'accompagner tout au long de mon stage de master 2, tu m'as initié à la chromatographie en phase gazeuse, aux réparations de fortune (qualité inestimable en recherche) et a fait preuve d'une patience à toute épreuve face à mes questionnements incessants, un grand merci à toi ! Nathalie, tu m'as initié à la chromatographie liquide et à la merveilleuse technologie qu'est la spectrométrie de masse et qui n'a de cesse de me hanter depuis ! Tu as un don pour la pédagogie dont j'ai usé et abusé pendant ma thèse. Catherine, ton arrivée dans l'équipe a permis au labo de prendre un tournant considérable, j'ai beaucoup apprécié ta façon de travailler et j'espère que nos échanges t'ont été aussi profitables qu'à moi.

Un très grand merci à **Sophie Rolland, Françoise Le Prince, Patrick Leconte** et **Vanessa Clouet**, vos soutiens psychologiques et techniques sont réellement inestimables ! Que ce soit pour votre sens de l'organisation, votre savoir-faire ou encore votre efficacité, ma thèse n'aurait jamais abouti sans vous. Merci Patrick, de m'avoir fait découvrir les secrets de la culture du colza ainsi que pour ton aide précieuse tout au long de mes travaux. Merci Sophie, pour ton soutien inébranlable et ton aide précieuse dans bien trop de domaines pour les cités ici ! Merci Françoise et Vanessa pour votre disponibilité et votre soutien technique.

Je tiens également à remercier **Pascale Le-Nevé** pour nous rendre la vie administrative aussi simple, **Maryline Robert** pour être toujours aussi agréable et faciliter nos déplacements, **Géraldine Blondel** pour ton écoute et ton efficacité.

Je remercie du fond du coeur mes collègues et inestimables amis qui ont toujours été présents, dans les bons et mauvais moments, pour me soutenir dans cette aventure. J'ai nommé, **Benjamin** et **Anaïs Liegard** ainsi que leurs deux adorables filles **Zoé** et **Lola**. Votre soutien inconditionnel, nos nombreuses soirées, discussions, repas font parties de mes souvenirs les plus agréables de ces trois années et j'espère que vous continuerez de transmettre votre hospitalité et vos sourires aux autres. Je remercie **Yoann Aigu**, pour nos discussions, nos incalculables matchs de baby-foot et de billard le midi, notre soutien mutuel dans les périodes de "galères" et pour ton hospitalité à la fin de ma thèse. Tu as largement contribué à l'ambiance du bureau du fond et à sans aucun doute rendu ces trois années beaucoup plus agréables à vivre. Je remercie **Alexandre Pelé** pour tes cours de baby-foot et nos nombreux 'pétages de câble' du bureau du fond. À ce titre je remercie **Anne-Sophie Bouchet** pour avoir toujours su nous montrer l'exemple et tempérer nos "crises" mais aussi pour m'avoir fait découvrir les bars de Rennes. Merci à **Erwan Corlouer**, d'abord pour nous avoir supportés pendant ton stage d'ingénieur, puis pour avoir su parfaitement t'intégrer et contribuer activement à la bonne ambiance du bureau du fond. Je remercie également **Thanina Azibi**, **Julie Ferreira de Carvalho** et **Grégoire Bianchetti** pour avoir enrichit notre groupe et nous avoir conforté dans l'idée que nous n'étions pas (les seuls) fous.

Je remercie chaleureusement **Roberto Morino** et **Élise Bizouerne** pour avoir accepté de subir mon encadrement pendant leur stage de master 1 et de master 2 respectivement. Votre investissement a été formidable et a largement contribué à l'enrichissement de mes travaux de thèse ainsi qu'à mon enrichissement personnel et professionnel.

Je remercie **David Renaud** pour m'avoir fait découvrir plus en profondeur le RFMF Junior. Je remercie également l'ensemble du **RFMF** et du **RFMF Junior** pour m'avoir fait confiance et attribuer la place de vice-président du RFMF Junior. Cet investissement associatif continue d'être une source d'enrichissement permanent.

Je remercie sincèrement mon tuteur en licence, **Jean-Philippe Biolley**, pour m'avoir soutenu dans mes projets universitaires, ainsi que l'équipe pédagogique de biologie végétale de l'université de Poitiers qui a largement contribué à l'épanouissement de mes projets professionnels et plus particulièrement **Nathalie Pourtaux**, **Rossitza Atanassova**, **Sylvain La Camera**, **Laurence Maurousset**, **Fabienne Dedaldechamp**, **Pierre Coutos-Thevenot**, **Maryse Laloi** et **Mireille Faucher**.

Un grand merci à mes encadrants de stage, notamment **Véronique Pautot** pour m'avoir fait découvrir le monde de la recherche, mon stage avec toi reste gravé dans ma mémoire. Merci également à **Nicolas Navrot** de m'avoir fait découvrir la chromatographie liquide et les bases du métabolisme végétal, ce stage a largement orienté mon choix de thèse.

J'adresse mes remerciements à mes proches et à ma famille. **Laure Bernard** pour avoir continué de croire en moi pendant cette longue période, pour avoir été sans cesse présente à mes côtés et pour ton

soutien inconditionnel. Tu m'as apporté le courage de continuer et sans toi cette thèse serait certainement restée inachevée. Je remercie ma famille les **Domis** et **Bastien Dechaumet** pour votre soutien tout au long de ma vie ainsi que pour avoir toujours su me garder une place au chaud dans la maison familiale.

ABRÉVIATIONS

A

| | |
|-------|--|
| AAP | Perméases aux Acides Aminés Amino Acid Permeases |
| ADN | Acide DésoxyriboNucléique Deoxyribo Nucleic Acid |
| ADP | Adénosine DiPhosphate Adenosine DiPhosphate |
| AEE | Agence Européenne pour l'Environnement European Environment Agency |
| AlaAT | Alanine AminoTransférase Alanine aminotransferase |
| AMP | Adénosine MonoPhosphate Adenosine MonoPhosphate |
| AMTs | Transporteurs d'ammonium Ammonium Transporters |
| APCI | Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique Atmospheric Pressure Chemical Ionization |
| APCs | Facilitateurs à acides aminés - polyamines et choline Amino acid-Polyamine-Choline facilitators |
| APs | Protéases Aspartique Aspartic Proteases |
| ARCs | Modifications liées à l'âge Age-Related Changes |
| ARN | Acide RiboNucléique RiboNucleic Acid |
| ATGs | Gènes d'Autophagie AuTophagy Genes |
| ATP | Adénosine TriPhosphate Adenosine TriPhosphate |

B

| | |
|-------|---|
| BFN 1 | Nucléase bi-fonctionnelle 1 Bi-Functional Nuclease 1 |
|-------|---|

C

| | |
|------|--|
| CAT | Transporteurs d'acides aminés cationiques Cationic Amino acid Transporter |
| CCA | Analyses des corrélations canoniques Canonical Correlation Analysis |
| CCVs | Vésicules contenant des vésiculations chloroplastiques Chloroplast vesiculation Containing Vesicles |

| | |
|--------------|--|
| CE | Electrophorèse capillaire Capillary Electrophoresis |
| CI | Ionisation chimique Chemical Ionization |
| CIPAN | Cultures Intermédiaires Pièges à Nitrate Autumn cover crops |
| CLC | Canaux chlorure Chloride Channel |
| CPs | Protéases à Cystéine Cysteine Protease |
| CTE | Chaîne de Transfert des Electrons Electron Transport Chain |

D

| | |
|--------------|---|
| DNase | DésoxyriboNucléASE Deoxyribonuclease |
|--------------|---|

E

| | |
|-------------|---|
| EAA | EfficiencE d'Assimilation de l'Azote Nitrogen assimilation efficiency |
| EAbA | EfficiencE d'Absorption de l'Azote Nitrogen uptake efficiency |
| EI | Impact électronique Electron Ionization |
| ERA | EfficiencE de Remobilisation de l'Azote Nitrogen remobilization efficiency |
| ESI | Ionisation générant un électrospray ElectroSpray Ionization |
| EUA | EfficiencE d'Usage de l'Azote Nitrogen use efficiency |
| EUtA | EfficiencE d'Utilisation de l'Azote Nitrogen utilization efficiency |

F

| | |
|---------------|--|
| FT-ICR | Spectroscopie de masse à résonance cyclotronique des ions à Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance |
| FT-IR | Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier Fourier Transform InfraRed |

G

| | |
|--------------|--|
| GC | Chromatographie de partage en phase gazeuse Gas Chromatography |
| GC-MS | Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de Gas Chromatography-Mass Spectrometry |
| GDC | Glycine DéCarboxylase Glycine Decarboxylase |
| GlxT | Glyoxylate AminoTransférerase Glyoxylate Aminotransferase |

GOGAT Glutamine-2-OxoGlutarate AminoTransférase

[Glutamine-2-oxoglutarate aminotransferase](#)

GS Glutamine Synthétase

[Glutamine Synthetase](#)

H

HATS Transporteurs d'azote à haute affinité

[High Affinity Transport System](#)

2-HGDH D-2-HydroxyGlutarate DésHydrogénase

[D-2-Hydroxyglutarate Dehydrogenase](#)

HPLC Chromatographie de partage en phase liquide éluée à haute

[High Pressure Liquid Chromatography](#)

HPP Histidine-Proline-Proline transporteurs

[Histidine-Proline-Proline transporter](#)

HRMS Détecteur de masse à haute résolution

[High-Resolution Mass Spectrometry](#)

I

IMS Spectrométrie à mobilité ionique

[Ion Mobility Spectrometry](#)

IVDH IsoValeryl-CoA DésHydrogénase

[Isovaleryl-CoA dehydrogenase](#)

L

LABERCA LABoratoire d'Etude des Résidus et Contaminants des Aliments

[Laboratory for Residues and Contaminants in Food](#)

LATS Transporteurs d'azote à basse affinité

[Low Affinity Transport System](#)

LC Chromatographie en phase liquide

[Liquid Chromatography](#)

LC-MS Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de

[Liquid Chromatography-Mass Spectrometry](#)

LHC Antenne collectrice de lumière

[Light-Harvesting Complexes](#)

LKR Lysine Ketoglutarate Réductase

[Lysine \$\alpha\$ -ketoglutarate reductase](#)

LTH Transporteur lysine/histidine

[Lysine/Histidine-like Transporters](#)

M

MALDI Désorption et ionisation laser assistée par une matrice

[Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization](#)

MALDI-TOF Désorption et ionisation laser assistée par une matrice couplée à un

[Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight](#)

mGWAS Etudes d'association pangénomique combinées à la métabolomique

[metabolite with Genome-Wide Association Studies](#)

MPs Métallo-Protéases

[Metalloproteases](#)

| | |
|---------------|--|
| mQTL | Locus associé à un caractère métabolique quantitatif Metabolite-associated Quantitative Trait Loci |
| MS | Spectrométrie de masse Mass Spectrometry |
| MS/MS | Spectrométrie de masse en tandem Mass Spectrometry/Mass Spectrometry or tandem mass |
| MSn | Spectrométrie de masse par fragmentation en <i>n</i> étapes Multistage Mass Spectrometry |
| N | |
| NADP | Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate |
| NiR | Nitrite Réductase Nitrite reductase |
| NIRS | Spectroscopie proche infrarouge Near InfraRed Spectroscopy |
| NPF | Famille de transporteurs de nitrate 1 et transporteur de peptide Nitrate transporter 1 and Peptide transporter Family |
| NR | Nitrate Réductase Nitrate reductase |
| NRT2 | Transporteur de nitrate 2 NitRate Transporter 2 |
| O | |
| OAT | Ornithine-delta-AminoTransférase Ornithine aminotransferase |
| OPLSDA | Variante orthogonale de la régression des moindres carrés partiels Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis |
| P | |
| P2M2 | Plateau de Profilage Métabolique et Métabolomique Metabolic Profiling and Metabolomic Platform |
| P5C | Pyrroline-5-Carboxylate Pyrroline-5-Carboxylate |
| P5CDH | Pyrroline-5-Carboxylate DésHydrogénase Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase |
| PAPs | Phosphatases acides violettes Purple Acid Phosphatases |
| PCA | Analyse en composante principale Principal Component Analysis |
| Pi | Phosphate inorganique Inorganic phosphate |
| PLSDA | Régression des moindres carrés partiels Partial Least Squares Discriminant Analysis |
| ProDH | Proline DésHydrogénase Proline dehydrogenase |
| ProT | Transporteur de proline et glycine bêtaïne Proline and Glycine Betaine Transporters |

PSI/II Photosystèmes I/II
[PhotoSystem I/II](#)

PT Transporteur de phosphate
[Phosphate Transporter](#)

R

RMN Résonance Magnétique Nucléaire
[Nuclear Magnetic Resonance](#)

RNase RiboNucléase
[Ribonuclease](#)

ROS Espèces Réactives de l'Oxygène
[Reactive Oxygen Species](#)

RuBisCO Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxigénase
[Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase](#)

S

SaccDH Saccharopine DésHydrogénase
[Saccharopine Dehydrogenase](#)

SAVs Vacuoles associées à la Sénescence
[Senescence-Associated Vacuoles](#)

SHMT Sérine HydroxyMethylTransférase
[Serine Hydroxymethyltransferase](#)

SLAC/SLAH Canal ionique lent
[SLow Anion Channel-Associated Homologues](#)

SMCSO S-Méthyl Cystéine SulfOxyde
[S-methyl Cysteine Sulphoxide](#)

SPs Protéases à Sérine
[Serine Proteases](#)

SUC Saccharose
[SUCrose](#)

SVM Séparateur à Vaste Marge
[Support Vector Machines](#)

U

UHPLC Chromatographie liquide à ultra haute performance
[Ultra High Pressure Liquid Chromatography](#)

UMAMITs Habituellement, plusieurs acides aminés entrent et sortent
[Usually Multiple amino Acids Move In and out Transporters](#)

UV Ultra-violets
[UltraViolet](#)

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION GÉNÉRALE | 1 |
| CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE | 6 |
| 1. PRODUCTION ET CULTURE DU COLZA | 6 |
| 1.1. <i>Cycle cultural du colza</i> | 6 |
| 1.2. <i>Transformation et produits dérivés du colza</i> | 6 |
| 1.3. <i>La gestion des nutriments au cours du cycle cultural du colza d'hiver</i> | 7 |
| 2. L'EFFICIENCE D'USAGE DE L'AZOTE AU COURS DU CYCLE CULTURAL DU COLZA D'HIVER | 8 |
| 2.1. <i>L'efficacité d'absorption de l'azote</i> | 9 |
| 2.2. <i>L'efficacité d'assimilation de l'azote</i> | 10 |
| 2.3. <i>L'efficacité de remobilisation de l'azote</i> | 11 |
| 3. LA SÉNESCENCE FOLIAIRE CHEZ LE COLZA | 12 |
| 3.1. <i>Morphogenèse et différenciation de la feuille</i> | 12 |
| 3.2. <i>Définition de la sénescence</i> | 13 |
| 3.3. <i>Marqueurs et régulations de la sénescence foliaire</i> | 14 |
| 3.4. <i>Les processus de dégradation des composés azotés</i> | 15 |
| 3.5. <i>Les mécanismes de transport des composés azotés</i> | 17 |
| 3.6. <i>La remobilisation des autres composés</i> | 19 |
| 3.7. <i>Les processus énergétiques associés à la sénescence</i> | 21 |
| 4. L'APPROCHE MÉTABOLOMIQUE EN SOUTIEN À DES QUESTIONNEMENTS PHYSIOLOGIQUES | 23 |
| 4.1. <i>Historique et définition de la métabolomique</i> | 23 |
| 4.2. <i>L'intérêt et les ambitions des approches métabolomiques</i> | 24 |
| 4.3. <i>Workflow en métabolomique non ciblée par spectrométrie de masse</i> | 26 |
| 4.4. <i>Limites et trajectoire de la métabolomique</i> | 29 |
| 5. L'INTÉRÊT DES APPROCHES MULTI-OMIQUES | 30 |
| 6. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE..... | 32 |
| MATÉRIEL & MÉTHODES | 36 |
| 1. MATÉRIEL VÉGÉTAL ET CONDITIONS DE CULTURE | 36 |
| 1.1. <i>Matériel végétal</i> | 36 |
| 1.2. <i>Culture en serre à lumière naturelle</i> | 36 |

| | | |
|------|--|----|
| 1.3. | <i>Culture en chambre climatique</i> | 38 |
| 1.4. | <i>Prélèvements du phloème</i> | 38 |
| 1.5. | <i>Infiltration de marqueurs isotopiques dans des disques foliaires</i> | 39 |
| 2. | MESURES PHYSIOLOGIQUES..... | 39 |
| 2.1. | <i>Mesures de la biomasse et de la surface foliaire</i> | 39 |
| 2.2. | <i>Mesures spectro-colorimétriques des feuilles</i> | 40 |
| 2.3. | <i>Mesure de la teneur relative en chlorophylles</i> | 40 |
| 2.4. | <i>Mesure du rendement quantique de la photochimie des photosystèmes II</i> | 40 |
| 2.5. | <i>Mesures des radiations photosynthétiquement actives</i> | 41 |
| 3. | MÉTHODES D'EXTRACTION DES MÉTABOLITES..... | 41 |
| 3.1. | <i>Extraction combinée des composés polaires et apolaires</i> | 41 |
| 3.2. | <i>Extraction des phytohormones</i> | 43 |
| 4. | TECHNIQUES DE PROFILAGE MÉTABOLIQUE CIBLÉ..... | 43 |
| 4.1. | <i>Analyse des glucides, de leurs dérivés et des acides organiques libres</i> | 44 |
| 4.2. | <i>Analyse des acides aminés libres par UHPLC-UV</i> | 44 |
| 4.3. | <i>Analyse des massifs isotopiques des acides aminés libres par spectrométrie de masse (LC-MS)</i> | 45 |
| 4.4. | <i>Analyse des phytohormones</i> | 46 |
| 4.5. | <i>Dosage des glucosinolates</i> | 46 |
| 5. | PROFILAGE MÉTABOLIQUE NON CIBLÉ..... | 47 |
| 5.1. | <i>Analyse par LC-HRMS</i> | 47 |
| 5.2. | <i>Traitement des données</i> | 48 |
| 6. | PROFILAGE DE L'EXPRESSION DES GÈNES..... | 49 |
| 6.1. | <i>Extraction des ARNs, DNase et transcription inverse</i> | 49 |
| 6.2. | <i>Real-time PCR quantification</i> | 50 |
| 6.3. | <i>Profilage transcriptomique</i> | 50 |

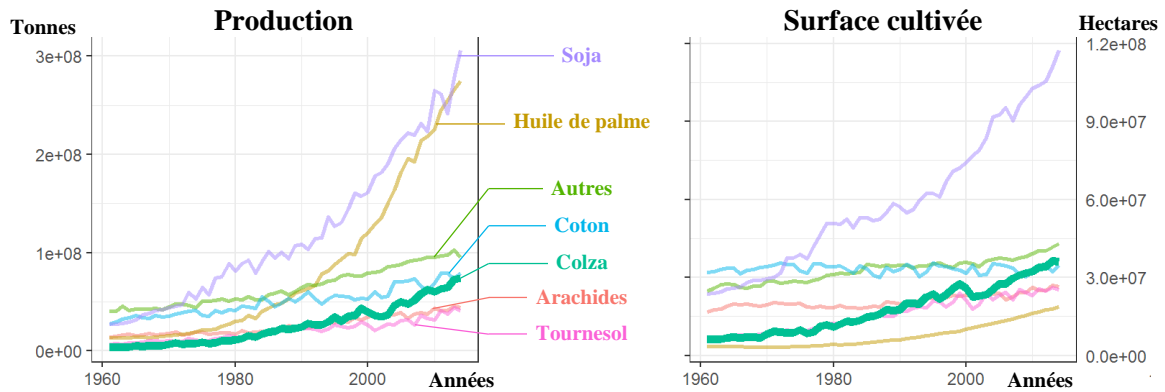
CHAPITRE 1 : RÉORGANISATION SPATIALE ET TEMPORELLE DU MÉTABOLISME AU COURS DU DÉVELOPPEMENT FOLIAIRE DU COLZA D'HIVER..... 52

| | | |
|------|--|----|
| 1. | INTRODUCTION..... | 52 |
| 2. | METABOLOME RECONFIGURATION OF LEAF DEVELOPMENT, SINK/SOURCE TRANSITION AND SENESCENCE IN <i>BRASSICA NAPUS L.</i> | 54 |
| 2.1. | <i>Introduction</i> | 55 |
| 2.2. | <i>Results</i> | 57 |
| 2.3. | <i>Discussion</i> | 63 |

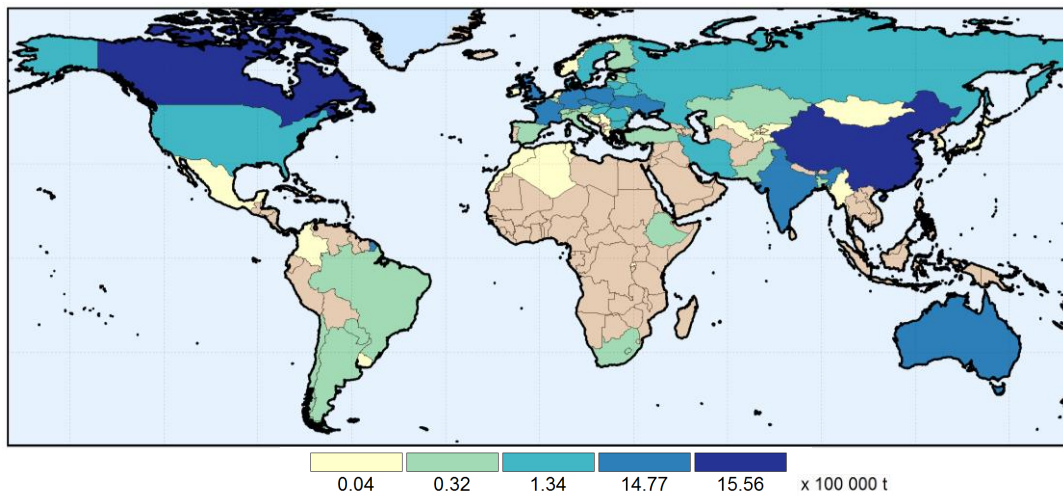
| | |
|---|------------|
| 2.4. <i>Material and methods</i> | 70 |
| 2.5. <i>Reagents and chemicals</i> | 70 |
| 3. CARTOGRAPHIE SPATIALE ET TEMPORELLE DU MÉTABOLISME ASSOCIÉ À LA SÉNESCENCE FOLIAIRE..... | 75 |
| 3.1. <i>Introduction</i> | 75 |
| 3.2. <i>Résultats</i> | 75 |
| 3.3. <i>Discussion</i> | 82 |
| 3.4. <i>Matériels et Méthodes</i> | 89 |
| CHAPITRE 2 : ORIENTATION MÉTABOLIQUE DE LA PROLINE PENDANT LA SÉNESCENCE FOLIAIRE AU COURS DU DÉVELOPPEMENT VÉGÉTATIF DU COLZA D'HIVER..... | 92 |
| 1. INTRODUCTION | 92 |
| 2. SENESCENCE-INDUCED PROLINE CATABOLISM AS A SOURCE OF SUBSTRATES AND ENERGY FOR NUTRIENT RECYCLING PROCESSES IN OILSEED RAPE LEAVES..... | 94 |
| 2.1. <i>Introduction</i> | 95 |
| 2.2. <i>Results</i> | 98 |
| 2.3. <i>Discussion</i> | 103 |
| 2.4. <i>Conclusion</i> | 107 |
| 2.5. <i>Material and Methods</i> | 107 |
| CHAPITRE 3 : VARIATIONS GÉNOTYPIQUES DU MÉTABOLOME ET DU TRANSCRIPTOME AU COURS DES PROCESSUS FOLIAIRES DE REMOBILISATION TROPHIQUE PENDANT LA PHASE REPRODUCTRICE DU COLZA DANS DIFFÉRENTS CONTEXTES DE FERTILISATION AZOTÉE..... | 112 |
| 1. INTRODUCTION | 112 |
| 2. METABOLOMIC AND TRANSCRIPTOMIC SIGNATURES OF NITROGEN DEFICIENCY AND NITROGEN REMOBILIZATION EFFICIENCY IN TWO OILSEED RAPE GENOTYPES..... | 115 |
| 2.1. <i>Introduction</i> | 116 |
| 2.2. <i>Results and discussion</i> | 118 |
| 2.3. <i>Partial conclusion</i> | 122 |
| 2.4. <i>Material and Methods</i> | 123 |
| CONCLUSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES | 128 |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 135 |
| ANNEXES..... | 160 |

INTRODUCTION GENERALE

A : Cultures oléagineuses dans le monde entre 1960 et 2014



B : Production de colza dans le monde en 2014



C : Production et rendement en Europe

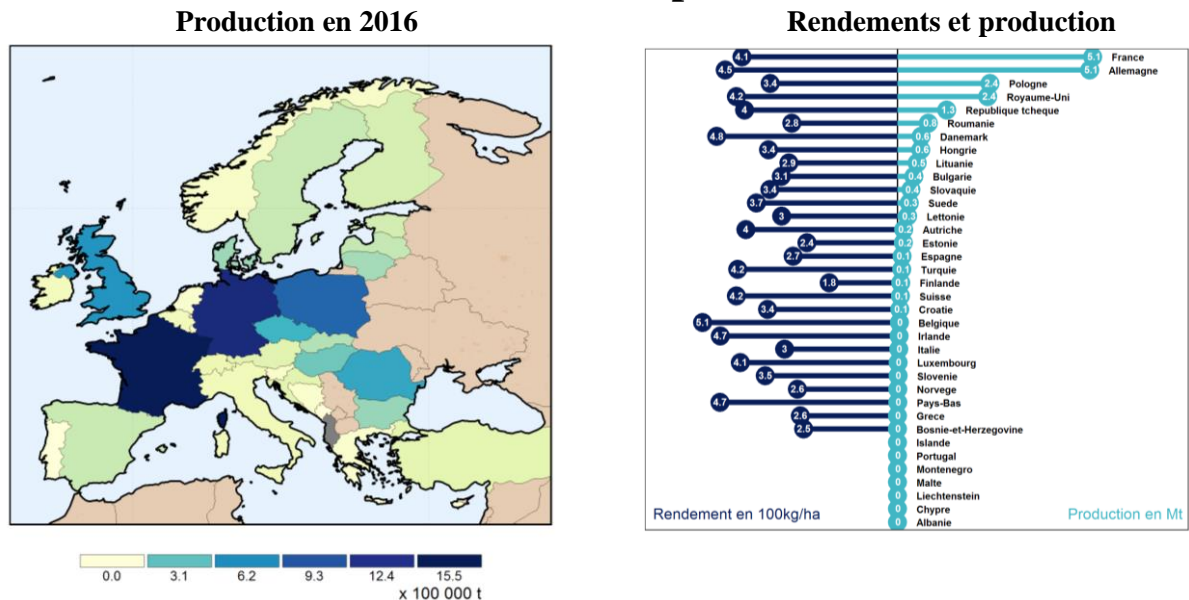


Figure 1 : Production et surfaces cultivées des principales cultures oléagineuses dans le monde entre 1960 et 2014 (A) avec une cartographie de la production mondiale de colza en 2014 (B) (données d'après FAOSTAT) accompagnée des surfaces cultivées en 2016 et des rendements et production en Europe entre 2011 et 2016 (C) (données d'après Eurostat et cartographie d'après Natural Earth).

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le colza (*Brassica napus L.*) est une plante annuelle de la famille des Brassicacées qui est principalement cultivée pour ses graines afin de produire des huiles alimentaires et industrielles et dont le tourteau protéique résiduel convient bien à l'alimentation du bétail. Originellement, le colza serait apparu il y a environ 7 500 ans (Chalhoub *et al.*, 2014) lors du croisement interspécifique spontané entre le chou (*Brassica oleracea*) et la navette (*Brassica rapa*). Les premières traces de sa domestication sont retrouvées en Inde, en Chine et au Japon à partir de 2 500 av. J-C (Gupta et Pratap, 2007). Son introduction en Europe remonterait au Moyen Âge où il aurait été cultivé dans un premier temps pour produire de l'huile à brûler, puis, beaucoup plus tardivement, du lubrifiant pour les moteurs à vapeur. Avant les années 1960, la qualité de l'huile de colza la rendait impropre à la consommation humaine et animale à cause de teneurs élevées et néfastes en acide érucique et en glucosinolates. Par la suite, sa place dans le marché des oléagineux a été considérablement renforcée avec la sélection et la production de variétés dites double-zéro (« 00 » ou canola) qui combinent de faibles teneurs en acide érucique (inférieures à 2 %) et en glucosinolates (inférieures à 20 µmoles pour les variétés dites « 00 » et 30 µmoles pour les variétés dites « canola »). La production a augmenté progressivement pour se placer aujourd'hui en première position pour la production de graines oléagineuses en Europe et en seconde position à l'échelle mondiale, derrière le soja. Les programmes de sélection variétale se sont alors diversifiés et ciblent aujourd'hui la sécurisation des rendements sous contraintes biotiques et abiotiques, l'amélioration du bilan énergétique de la culture en visant notamment la limitation des apports d'intrants ainsi que la réduction de l'empreinte environnementale des systèmes de production.

Largement répandue dans le monde avec 64 Mt produites en 2016 (d'après Terres Inovia) dont 20 Mt par l'Union Européenne, 15 Mt par le Canada et 12 Mt par la Chine, le colza est présent sur la quasi-totalité du territoire français sur une surface de 1,5 Mha pour une production de 5,1 Mt de graines (figure 1). Il existe deux types de colza cultivés : le colza dit « d'hiver » produit principalement en Europe et le colza dit « de printemps » cultivé majoritairement au Canada, en Australie et aux Etats-unis. Le colza d'hiver est semé entre août et septembre pour une récolte en juillet de l'année suivante (d'après Terres Inovia), alors que le colza de printemps est semé entre avril et mai. Les variétés d'hiver ont un cycle plus long (d'environ 300 jours contre 160 pour les variétés de printemps) et produisent des réserves végétatives avant l'hiver qui favorisent, après la

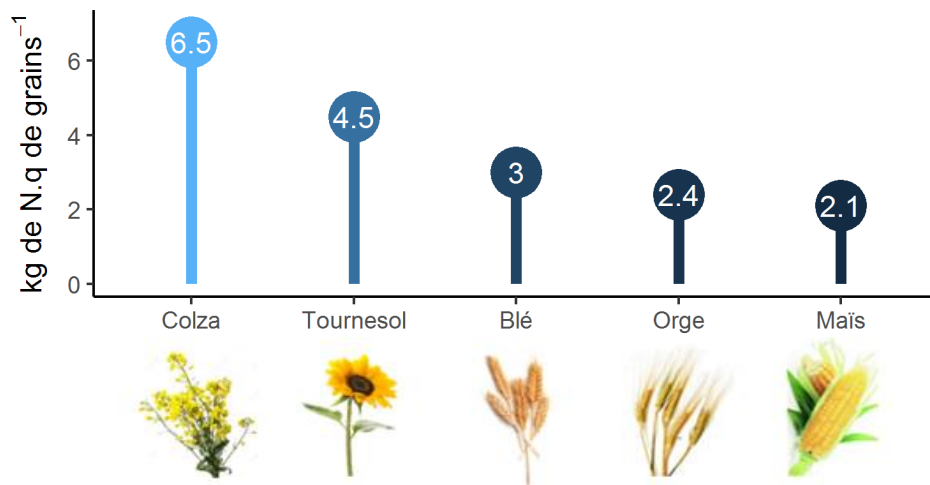


Figure 2 : Besoins en azote de quelques productions de grande culture en kg par q de grains produits (données d'après PROLEA, 2015).

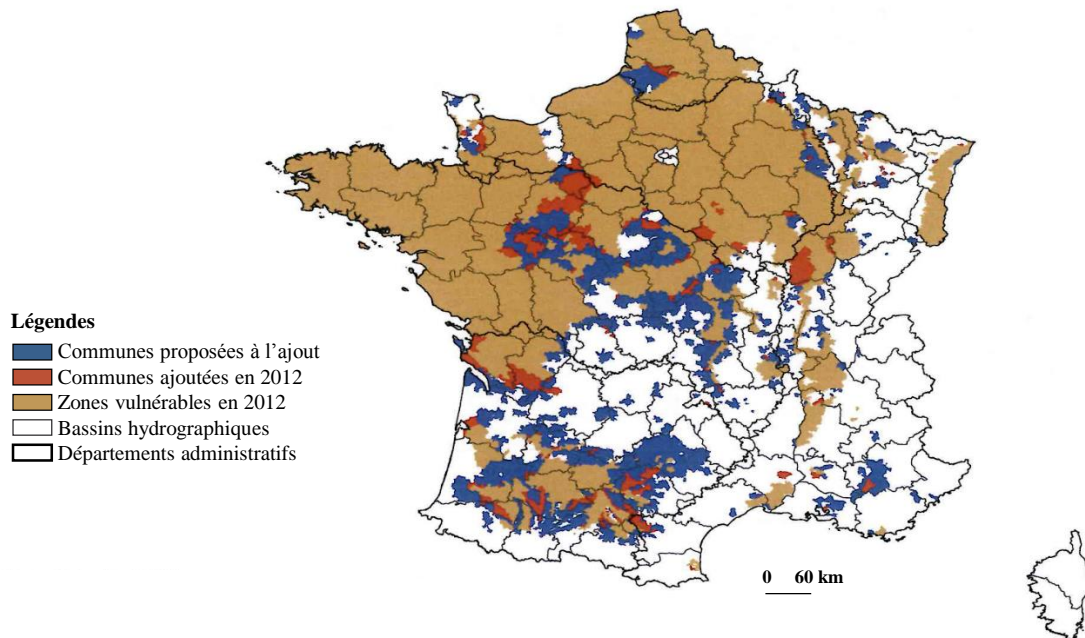


Figure 3 : Cartographie des zones considérées comme vulnérables en France selon la directive nitrates 2003 (d'après OIEau-MEDDE, 2014). Les zones identifiées ont des taux de nitrates enregistrés dans les cours d'eau supérieurs à 50 mg.ml⁻¹.

phase nécessaire de vernalisation, leur développement à la reprise de végétation. Ainsi les rendements sont de 20 à 30 % supérieurs par rapport aux variétés de printemps. Le colza est principalement utilisé pour produire des graines riches en huiles et protéines, mais également comme tête de culture pour casser le cycle des maladies des céréales ou encore pour augmenter la production de la culture de céréale qui suit. Il offre par ailleurs, une excellente couverture du sol pendant les phases automnale et hivernale et contribue efficacement, eu égard ses propriétés nitrophiles, à piéger efficacement le nitrate du sol.

L'huile de colza est une huile alimentaire de très bonne qualité largement plébiscitée par les nutritionnistes. En effet, c'est une source naturelle d'acides gras insaturés (92 %) et plus particulièrement d'acide linoléique oméga-3 et 6 (respectivement 9 et 22 %) aux effets bénéfiques sur la santé (Foster *et al.*, 2009). Mais la majeure partie de la production est destinée à la création d'énergies renouvelables via le biodiesel (environ 65 % de la production française).

Comme bon nombre d'espèces de grande culture, la forte productivité du colza s'appuie sur l'apport massif de fertilisants. Le colza se distingue des autres cultures par des besoins particulièrement importants en azote (de 180 à 250 kg.ha⁻¹) (figure 2), qui conditionnent directement le rendement final. Apporté principalement sous la forme de nitrate au printemps (Rathke *et al.*, 2006), la majeure partie de l'azote absorbé par la plante est retrouvée dans les siliques et les graines (66 %), le reste étant réparti entre les autres organes, notamment les tiges (15 %) et les feuilles mortes (10 %) (Malagoli *et al.*, 2005). Etant donné que seules les graines et les siliques sont récoltées, 44 % de l'azote apporté est restitué au sol, contribuant ainsi à la faible Efficience d'Usage de l'Azote du colza (EUA). Cette fertilisation azotée importante a deux impacts majeurs : un impact financier pour l'agriculteur, puisque l'apport d'engrais constitue 42 % des charges variables (Fédération Française des Producteurs d'Oléagineux et de Protéagineux, 2015) et un impact environnemental. En effet, l'excédent d'azote va entraîner un enrichissement des milieux naturels et des cours d'eau en nitrate ainsi qu'une émission de protoxyde d'azote, conduisant à l'eutrophisation des milieux naturels, à une pollution des ressources en eau et de l'atmosphère (Rothstein, 2007; Lassaletta *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015). La directive nitrate a été adoptée en Europe en 1991 pour réduire l'impact environnemental en limitant à 170 kg.ha⁻¹ l'apport d'azote organique dans les zones vulnérables (figure 3). Cette directive a permis de diminuer les fuites d'azote de 16 % entre 2000 et 2008 (Velthof *et al.*, 2014). Dans ce contexte agro-économique et agro-écologique de réduction des intrants azotés, la pérennité de la culture du colza va largement dépendre de sa capacité

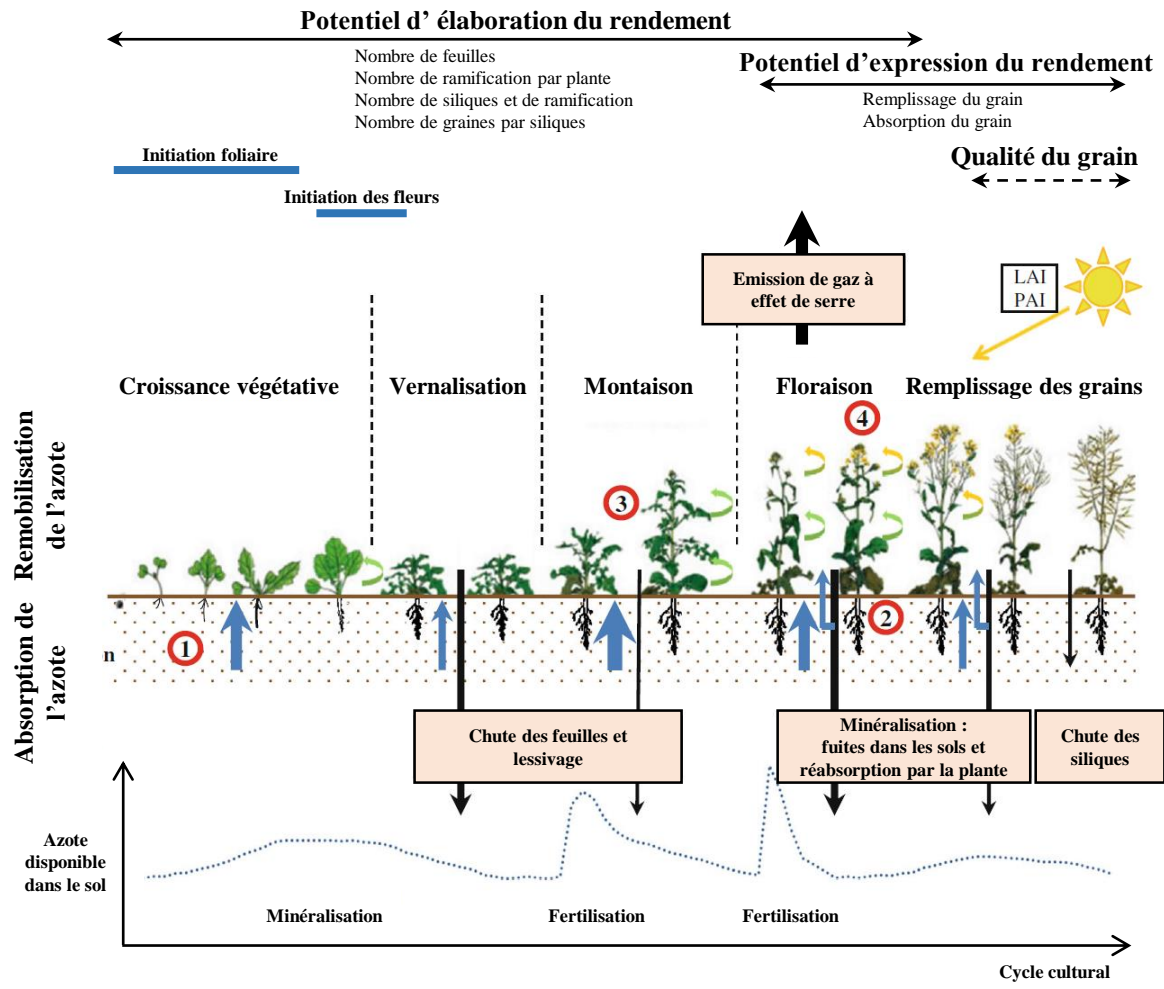


Figure 4 : Bilan schématique des dynamiques associées à la gestion de l'azote pendant le cycle cultural du colza et l'élaboration du rendement. L'absorption de l'azote est représentée par les flèches bleues dont la largeur est proportionnelle à la quantité absorbée. De la même manière, les pertes d'azote sont représentées par les flèches noires. Les quatre stades critiques pour l'élaboration finale de l'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA) sont entourés en rouge et les mécanismes limitants correspondent à : (1) l'efficacité de remobilisation de l'azote (ERA) pendant le développement végétatif, (2) l'efficacité d'absorption de l'azote (EAbA) pendant la phase de floraison, (3) l'ERA séquentielle et monocarpique pendant la floraison et le remplissage des siliques et (4) l'interaction entre l'EUA, l'index de surface foliaire (LAI) et l'index de surface des siliques (PAI) (d'après Bouchet *et al.*, 2016).

à maintenir des rendements élevés, ce qui nécessite très clairement d'améliorer, chez cette espèce, l'EUA.

Cependant l'EUA est un caractère complexe subdivisé, en trois composantes : l'Efficiences d'Absorption (EAbA), l'Efficiences d'Assimilation (EAA) et l'Efficiences de Remobilisation (ERA) de l'Azote (Salon *et al.*, 2014). Justifiant son utilisation comme Culture Intermédiaire Piège à Nitrate (CIPAN), l'absorption et l'assimilation de l'azote ne seraient pas limitantes chez le colza alors que plusieurs études ont montré que la ERA serait plus pénalisante, notamment au cours du vieillissement des tissus foliaires et de la chute prématurée de feuilles encore riches en azote organique (Malagoli *et al.*, 2005; Koeslin-Findeklee et Horst, 2016). Parmi les voies d'amélioration de l'EUA, l'adaptation des itinéraires culturaux au cycle de développement du colza permet de minimiser les fuites d'azote (figure 4) dans l'environnement en adaptant les apports à la vitesse de développement, au climat ou encore en modifiant la nature des fertilisants (Rathke *et al.*, 2005; Rathke *et al.*, 2006). Associé à un micro-management de la fertilisation en fonction de la nature des sols sur les parcelles, il est possible de maximiser l'absorption de l'azote par la culture tout en limitant l'impact sur les sols. Une autre voie majeure d'amélioration est d'exploiter la diversité génétique par la sélection variétale assistée par marqueurs (Bouchet *et al.*, 2016; Afzal *et al.*, 2018). Cependant, l'efficacité de cette approche dépend des caractères ciblés et de la pertinence des marqueurs utilisés. De plus, si l'EUA est relativement simple à mesurer, l'EAA et l'ERA sont plus complexes à phénotyper et à évaluer. L'utilisation de marqueurs phénotypiques et moléculaires pour estimer ces composantes et en évaluer la variabilité génétique est un point central pour diriger la sélection variétale. L'ERA est associée à des processus de recyclage métabolique et de translocation entre organes sources et organes puits, soutenus par des réseaux et des flux qu'il convient donc de décortiquer.

Les travaux réalisés pendant cette thèse ont consisté à entreprendre la dissection métabolique du développement foliaire chez le colza et l'analyse spatio-temporelle des ajustements opérés sur ce métabolisme notamment au cours de la sénescence en lien avec des problématiques de remobilisation de ressources dans la plante, de relations sources/puits et d'efficacité d'utilisation et de recyclage du carbone et de l'azote.

Ce manuscrit est organisé en trois chapitres précédés par une synthèse bibliographique et un matériel et méthodes détaillant les moyens analytiques mis en oeuvre pendant la thèse. Les chapitres sont construits autour d'articles scientifiques destinés à publication

et complétés par des éléments de contextes bibliographique et scientifique replaçant les problématiques abordées par rapport aux connaissances actuelles. Ils sont suivis d'une discussion générale des principaux résultats et d'éléments de conclusion et de perspectives pour les recherches futures. En annexe est rassemblé, l'ensemble des communications orales et écrites réalisées dans le cadre de la thèse ainsi que toutes les activités extra-recherche entreprises durant le contrat doctoral.

Environnement et Financement de la thèse

Ce programme de thèse a été conduit au sein de l'Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes (IGEPP), UMR associant l'INRA à Agrocampus Ouest et à l'Université de Rennes 1 et dirigée actuellement par Maria Manzanares-Dauleux, Professeure à Agrocampus Ouest. Les recherches de l'IGEPP participent à l'acquisition de connaissances et au développement de méthodes innovantes et durables dans les domaines de la production et la protection des plantes en s'appuyant sur l'analyse multi-échelles des processus biologiques, écologiques et évolutifs en œuvre dans les agro-écosystèmes. Dans ce cadre, c'est dans l'équipe « Rendement sous Contraintes Abiotiques », dirigée par Alain Bouchereau, Professeur à l'Université de Rennes 1, que les travaux de thèse ont été réalisés, sous sa responsabilité. Les travaux de l'équipe visent à révéler les déterminants génétiques et physiologiques qui gouvernent l'élaboration du rendement, l'efficacité d'utilisation des nutriments et de l'eau ainsi que la qualité de la graine chez le colza. Le caractère analytique du projet de thèse, centré sur le métabolisme, a conduit à utiliser très largement les outils du plateau de profilage métabolique et de métabolomique (P2M2) de l'unité ainsi que ceux du Laberca à Nantes, les deux entités étant associées au sein de la plateforme distribuée de métabolomique « Corsaire » du GIS Biogenouest. Par ailleurs, s'agissant des ressources biologiques et des génotypes de colza valorisés dans ce projet, leur mise à disposition a reposé sur le fonctionnement du Centre de Ressources Biologiques BraCySol de l'Unité et tout le travail de production et de conduite de culture s'est appuyé sur les installations expérimentales de l'Unité.

Le contrat doctoral qui a encadré cette thèse, a été engagé auprès d'Agrocampus Ouest. Le soutien salarial a été assuré pour un co-financement de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), via le Département Biologie et Amélioration des Plantes (BAP) et la région Bretagne sous la forme d'une Allocation de Recherche Doctorale. Les frais de fonctionnement ont été supportés par l'équipe d'accueil dans le cadre du projet Rapsodyn, projet Investissements d'Avenir, financé par l'Agence Nationale pour la

Recherche. Ce projet, coordonné par Nathalie Nesi, Directrice de Recherches à l'INRA, a pour ambition d'assurer la compétitivité à long terme de la production de colza. Dans un contexte de réduction des intrants azotés, l'objectif final est de créer des variétés de colza utilisant mieux l'azote et à teneur et rendement en huile optimisés.

CONTEXTE
BIBLIOGRAPHIQUE

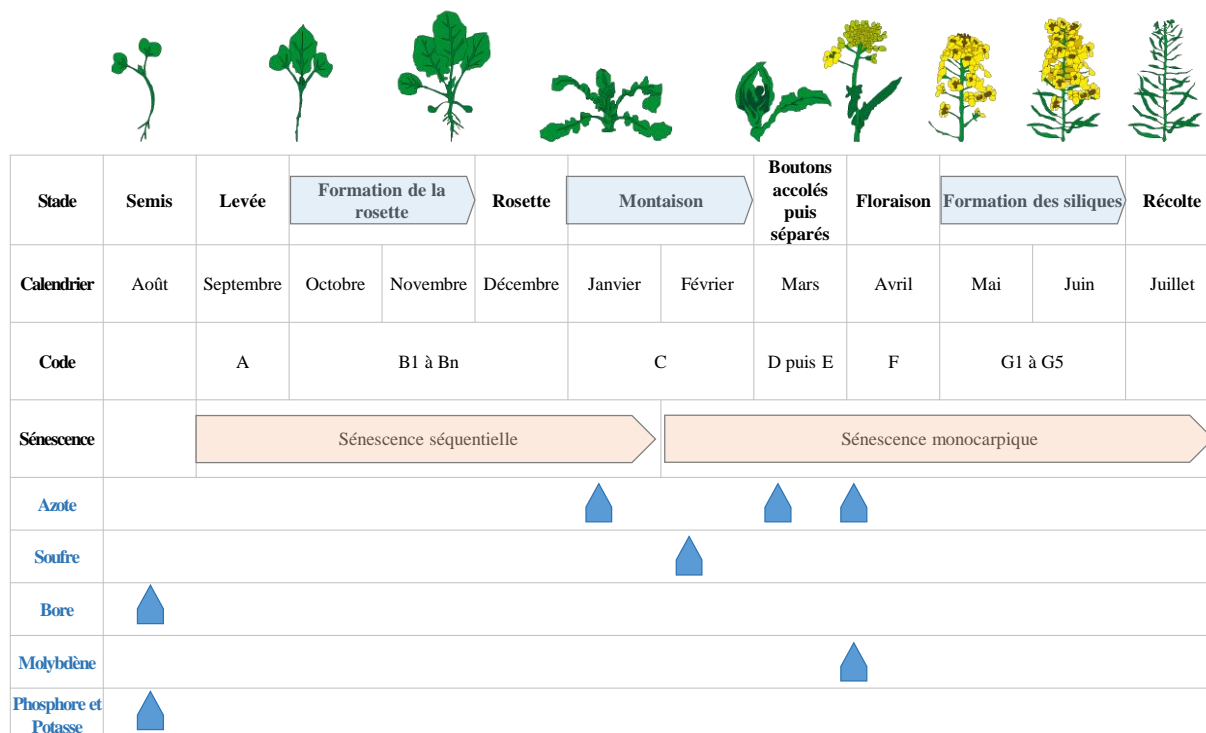


Figure 5 : Chronologie des différents stades de développement du colza, du semis à la récolte. Les périodes d'apports des principaux éléments nutritifs sont également signalées (▲) (modifié d'après Terres Inovia, 2017). Durant la phase végétative (A à C), les ressources sont allouées à la production de nouvelles feuilles, alimentées par les nutriments présents dans le sols et la remobilisation des ressources endogènes pendant la sénescence séquentielle. Durant la phase reproductrice (C à G), les ressources sont allouées à la production des organes reproducteurs, alimentées par les processus de remobilisation associés à la sénescence monocarpique.

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Production et culture du colza

1.1. Cycle cultural du colza

En France, le colza d'hiver est semé de mi-août à fin septembre avec une densité de semis de 30 à 60 graines.m⁻² (Terres Inovia, 2017). Les stades de développement du colza se divisent en deux phases et sont notés de A à G (figure 5). La première phase dite « végétative » se traduit par la mise en place des structures foliaires et racinaires qui vont permettre d'asseoir l'architecture de la plante et son implantation avant l'hiver. Elle débute par la germination des graines qui se traduit par la sortie progressive des cotylédons (stade A), suivie par l'apparition des premières feuilles vraies (stade B) qui vont constituer la rosette et va se terminer au mois de décembre, lorsque la plante va entrer en dormance végétative. Cette phase est essentielle puisque les ressources accumulées vont conditionner le succès de la seconde phase dite « reproductive » ainsi que l'élaboration finale du rendement. La phase reproductive se traduit, après le processus de vernalisation indispensable à l'induction florale, par la mise en place des hampes florales (stade C), au cours du processus dit de « montaison » qui a lieu en février. Elle se traduit notamment par le développement des boutons floraux qui seront d'abord accolés (stade D) puis séparés (stade E) et enfin ouverts pendant la floraison (stade F). Une fois la fécondation réussie, les siliques et les graines vont se développer (stade G) pour arriver à maturité (stade G5) entre la fin-juin et la mi-juillet. Les graines sont alors récoltées alors que leur taux d'humidité a atteint 9 % environ. Chaque étape de ce processus développemental est associée à des relations trophiques adaptées entre les organes sources et les organes puits, ainsi qu'aux capacités d'acquisitions des nutriments différenciées et dépendantes des régimes de fertilisation et des conditions pédo-climatiques.

1.2. Transformation et produits dérivés du colza

Les graines de colza sont valorisées sous la forme d'huile et de biocarburant au cours des différents processus de transformation décrits ci-dessous (figure 6). De nombreux coproduits, sont eux, revalorisés en industrie chimique, alimentaire et cosmétique. La première étape consiste à nettoyer les graines de leurs impuretés (feuilles, tiges, etc) par

Composition des tourteaux et graines de colza (en %)

Source : Feedbase 2017

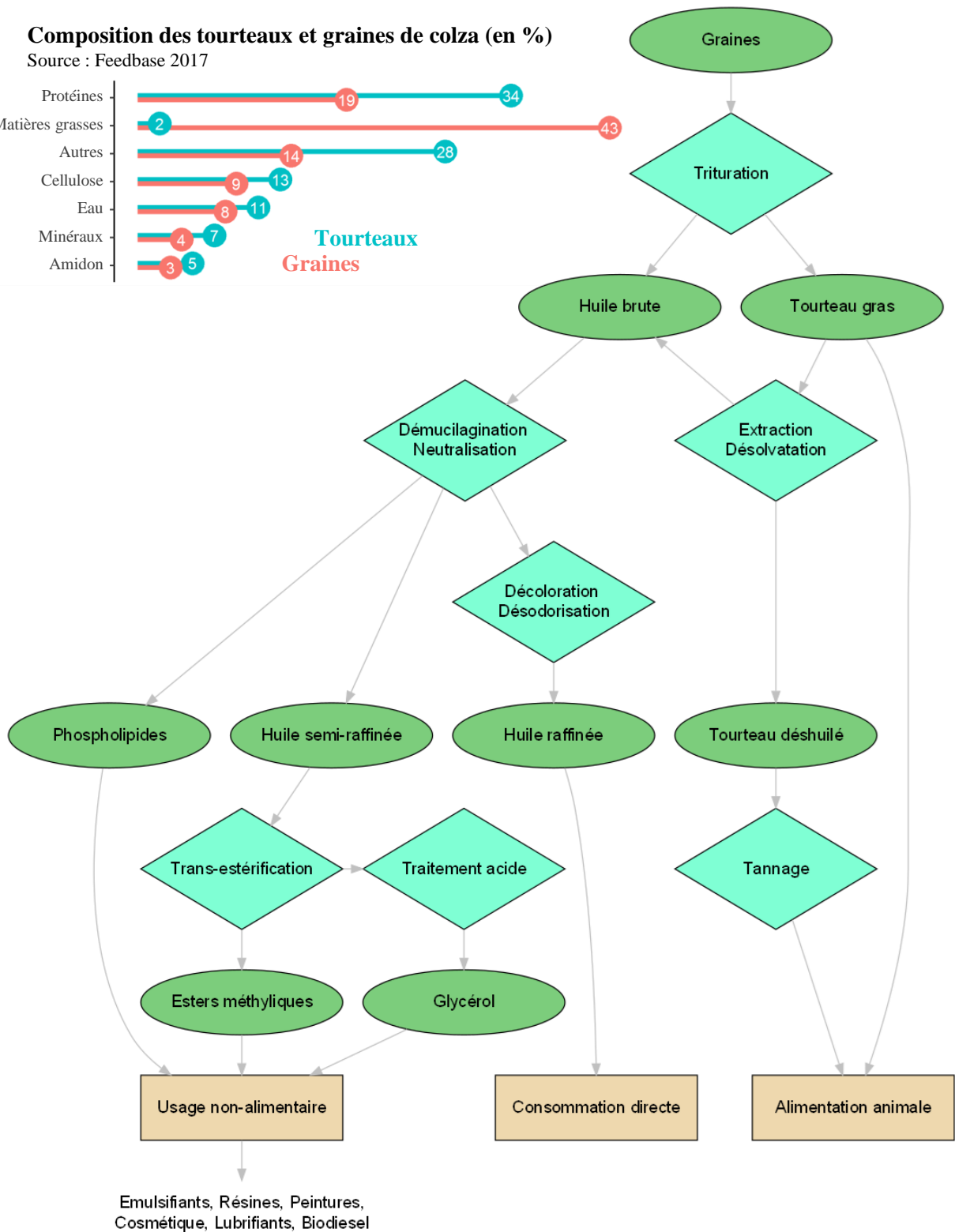
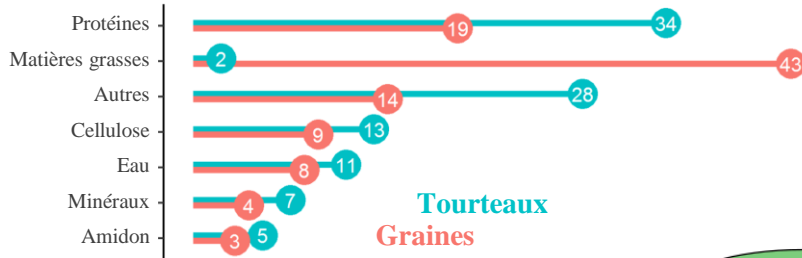


Figure 6 : Composition des graines et tourteaux de colza et principaux procédés de transformation des graines oléagineuses (modifiée d'après Terres Inovia 2017 et Feedbase 2017).

tamissage et aspiration d'air. Ensuite, des étapes optionnelles vont permettre de faciliter l'extraction de l'huile comme le dépelliculage des graines, le concassage ou le chauffage. L'extraction est réalisée par trituration, un procédé mécanique qui permet de récupérer l'huile brute d'un côté (qui constitue environ 43 % de la graine), et le tourteau gras de l'autre. L'huile extraite est qualifiée de « brute » et peut être directement utilisée en alimentation animale ou bien subir plusieurs niveaux de raffinage en fonction de son utilisation (Pages *et al.*, 2010). Le dégommage et la neutralisation vont permettre d'éliminer les phospholipides (valorisables en tant qu'émulsifiants) et les acides gras libres, conduisant à une huile dite « semi-raffinée » principalement utilisée en industrie non-alimentaire. La transestérification permet de produire de la glycérine et des esters méthyliques d'acides gras. La transformation par traitement acide de la glycérine en glycérol est valorisée dans l'industrie cosmétique et chimique. De même, les esters méthyliques d'acides gras sont utilisés pour produire des solvants, des lubrifiants et surtout du biodiesel. Pour une utilisation alimentaire, l'huile semi-raffinée va être décolorée et désodorisée, ce qui va permettre d'éliminer les pigments, les composés volatils ainsi que les résidus de pesticides éventuellement présents pour élaborer une huile dite « raffinée » qui pourra être consommée. Les tourteaux gras, produits pendant le triturage, contiennent 10 à 20 % d'huile et sont principalement destinés à l'alimentation animale. Ils peuvent être utilisés directement ou bien déshuilés par extraction dans des solvants organiques pour abaisser la teneur en huile entre 0,5 et 2,5 %. L'huile contenue dans les solvants est récupérée par désolvatation et ajoutée à l'huile brute. La qualité des tourteaux destinés aux ruminants est souvent améliorée par un tannage des protéines, compressées et vendues sous la forme de granules.

1.3. La gestion des nutriments au cours du cycle cultural du colza d'hiver

Un rendement optimisé nécessite, dans le contexte de production actuel, de recourir à l'apport de fertilisants minéraux et/ou organiques. Les principaux éléments apportés (figure 5) et limitants dans les sols sont : l'azote (N) de 100 à 250 unités, le soufre (S) 75 unités, le potassium (K) de 30 à 70 unités et le phosphore (P) de 0 à 150 unités. D'autres éléments, généralement accessibles dans le sol, peuvent être ajoutés pour favoriser le développement de la plante : le bore de 0 à 0,3 unité et le molybdène de 0 à 0,1 unité. Parmi les espèces cultivées les plus courantes, le colza est particulièrement dépendant du N. C'est un élément majeur qui conditionne le rendement final ainsi que la qualité de

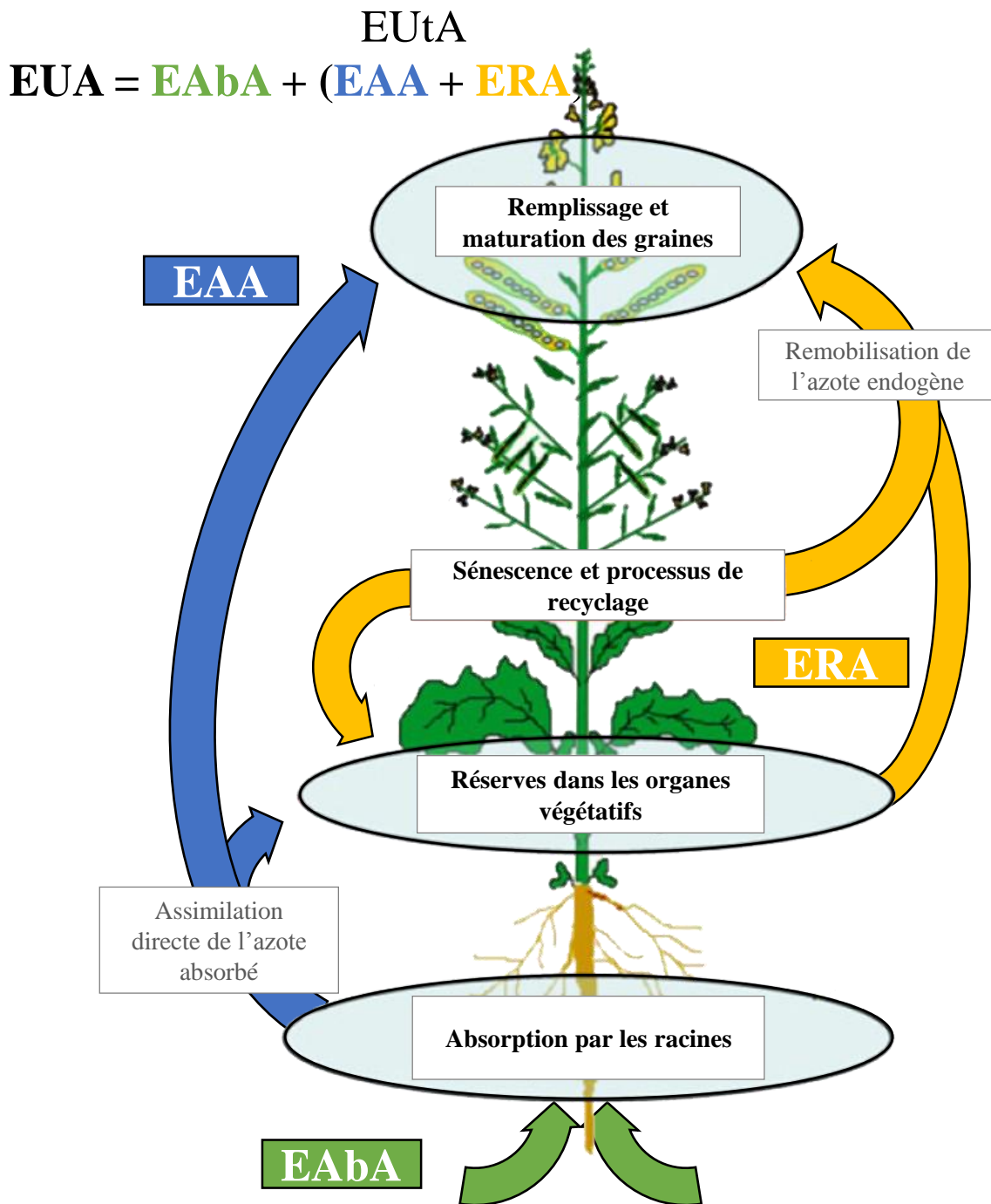


Figure 7 : Composantes de l'efficacité d'usage de l'azote (EUA) chez le colza. L'EUA est la combinaison de l'efficacité d'absorption de l'azote (EAbA) et de l'efficacité d'utilisation de l'azote (EUtA). Cette dernière est la résultante de l'efficacité d'assimilation (EAA) et de remobilisation (ERA) de l'azote (modifiée d'après Avice et Etienne, 2014).

l'huile. Le S, quant à lui, est particulièrement important chez les Brassicacées qui sont naturellement riches en composés soufrés comme les glucosinolates (Falk *et al.*, 2007). Le P est un composé essentiel, difficilement accessible par la plante et limitant dans 30 % des surfaces cultivées (Vance *et al.*, 2003). En outre, c'est une ressource non renouvelable, qui, introduite dans l'environnement conduit à des phénomènes d'eutrophisation, au même titre que le N. Les efficacités de prélèvement des nutriments dans le sol sont interdépendantes. Par exemple, une carence en S peut être partiellement compensée si le N n'est pas limitant (Dubousset *et al.*, 2009; Abdallah *et al.*, 2010), mais l'ajout de S permet, de son côté, d'améliorer l'efficacité de prélèvement du N par la plante (Jackson, 2000). La gestion du N par le colza est le point le plus problématique à cause du coût financier et environnemental lié à son utilisation. En effet, les normes Européennes visant à diminuer largement l'utilisation via la directive nitrate adoptée en 1991 et limitant l'utilisation à 170 kg.ha⁻¹ dans les zones sensibles. Chaque année, de nouvelles zones sont classées sensibles et couvrent, aujourd'hui, plus de la moitié du territoire français et européen d'après l'Agence Européenne pour l'Environnement (AEE). La pression politique pour réduire les engrais azotés est de plus en plus forte et la France a été condamnée par l'Union Européenne en 2013 et 2014 pour non-respect de la directive. L'un des enjeux majeurs pour pérenniser le colza sur le marché des cultures oléagineuses est de stabiliser les rendements en conditions de N limitantes. Les principales sources de pertes au cours de la culture sont liées (1) au lessivage des sols, (2) à l'émission de formes volatiles de N (ammoniac et protoxyde d'azote) (3) à un prélèvement partiel des fertilisants par la plante et (4) à un transfert non optimal aux organes photosynthétiques pendant la phase végétative et aux organes récoltés pendant la phase reproductive. Une bonne connaissance des sols ainsi que du climat est donc nécessaire pour limiter les pertes attribuées aux trois premiers points. Pour le dernier point, il convient de définir les principales voies métaboliques de distribution et de répartition de l'azote, ainsi que leurs flux respectifs et les régulations inhérentes, pour identifier les pistes d'amélioration.

2. L'efficacité d'usage de l'azote au cours du cycle cultural du colza d'hiver

L'Efficacité d'Usage de l'Azote (EUA) est un indicateur qui permet d'évaluer la capacité globale de valorisation du N exogène par une culture (figure 7). Initialement, l'EUA a été définie comme le rendement en grain par unité de N disponible dans le sol (Moll *et al.*, 1982). Cependant, cette définition dépend du type de culture, notamment des organes

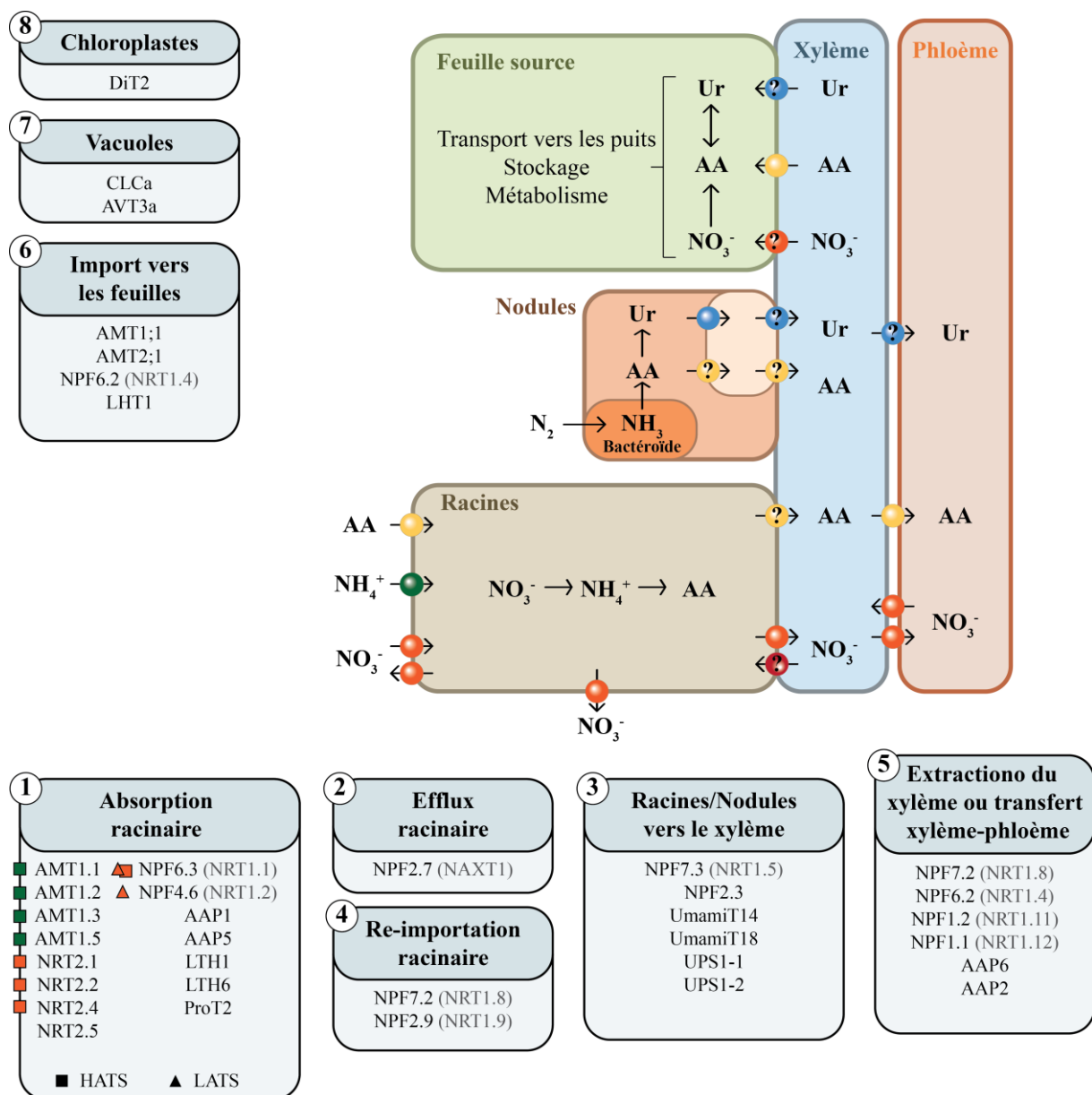


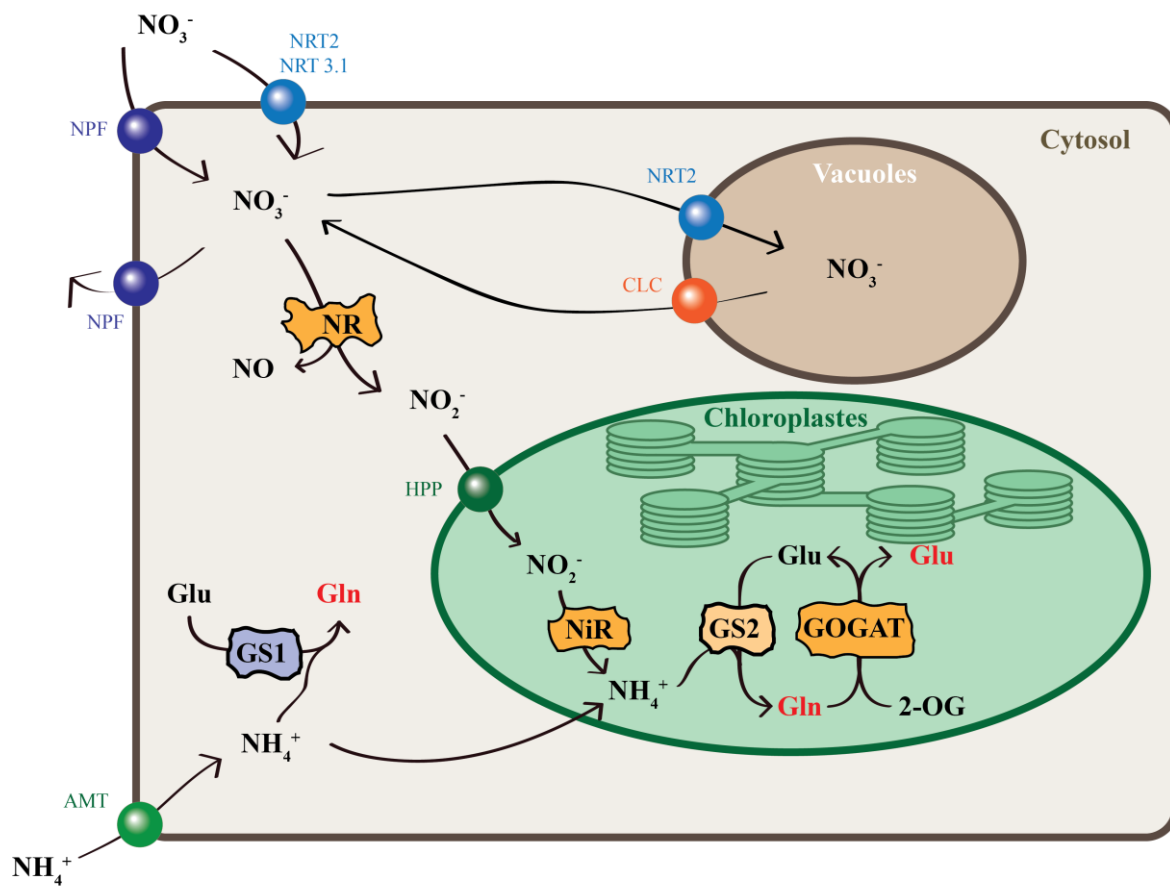
Figure 8 : Systèmes d'absorption et d'allocation de l'azote inorganique (NO_3^- en orange et NH_4^+ en vert) et organique (AA : acides aminés en jaune et Ur : urée en bleu) par les plantes. Les transporteurs mis en évidence chez *A. thaliana* sont listés par rapport à leur rôle dans (1) l'absorption racinaire avec les systèmes à haute et basse affinités (HATS et LATS), (2) l'efflux racinaire vers la rhizosphère (3) la translocation et le chargement dans le xylème, (4) la ré-importation dans la xylème, (5) l'évacuation du xylème et les transferts xylème-phloème, (6) l'import dans les cellules du mésophylle, (7) l'import dans les vacuoles du mésophylle et (8) les échanges vers les chloroplastes. Les points d'interrogation indiquent des mécanismes dont les transporteurs n'ont pas été identifiés (adaptée d'après Arsova *et al.*, 2011, Krapp, 2015, O'Brien *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2016 et Tegeder et Masclaux-Daubresse, 2018).

NRT : Nitrate Transporter ; NPF : Nitrate Transporter1 / Peptide Transporter Family ; AAP : Amino Acid Permease ; AMT : Ammonium Transporter ; AVT : Amino Acid Vacuolar Transporter ; CLC : Chloride Channel ; DiT : Dicarboxylate Transporter ; LHT : Lysine / Histidine-like Transporter ; NAXT : Nitrate Excretion Transporter ; ProT : Proline and Glycine Betaine Transporter ; UmamiT : Usually Multiple Acids Move In and Out Transporter ; UPS : Ureide Permease

récoltés et de la quantité de N apportée. Elle peut également varier en fonction du contexte. Par exemple, au stade végétatif l'EUA est calculée en fonction du N présent dans la totalité des parties aériennes (Balint et Rengel, 2008). En agronomie, la définition couramment utilisée correspond au rendement maximal de la culture par unité de N apportée. Les différentes méthodes de calcul ont été référencées par Good *et al.* (2004), qui décrit l'EUA comme un indicateur complexe, résultant de plusieurs processus qui sont rassemblés en deux composantes (figure 7) (d'après Avice et Etienne., 2014) : (1) la capacité de la plante à absorber le N présent dans le sol définie par l'Efficienc e d'Absorption de l'Azote (EAbA) et (2) la capacité de la plante à utiliser le N absorbé définie par l'Efficienc e d'Utilisation de l'Azote (EUtA). Cette seconde composante résulte de l'Efficienc e d'Assimilation de l'Azote (EAA) et de l'Efficienc e de Remobilisation de l'Azote (ERA) des organes vieillissants vers les organes en croissance. L'utilisation du ^{15}N comme marqueur isotopique sous la forme K^{15}NO_3 a permis de suivre les flux de N du sol vers les organes de la plante et entre les organes (Malagoli *et al.*, 2005; Abdallah *et al.*, 2010). Chaque composante est le produit de régulations et de processus cellulaires complexes décrits ci-après.

2.1. L'efficienc e d'absorption de l'azote

Les principales formes inorganiques de N disponibles pour la plante sont le nitrate (NO_3^-) et l'ammonium (NH_4^+) dont les concentrations dans le sol peuvent varier d'un facteur 100 pour le NO_3^- et d'un facteur 10 pour le NH_4^+ (Miller *et al.*, 2007). Le diazote (N_2) est également disponible dans le cas de certaines associations symbiotiques, ce qui n'est pas le cas du colza qui serait même affranchi, comme la plupart des Brassicacées de relations rhizosphériques avec des mycorhizes. La plante peut également prélever le N à partir de protéines, de peptides ou d'acides aminés. Chez le colza, l'EAbA est modérée mais constante pendant les premières étapes du développement végétatif puis très importante en sortie d'hiver, lorsque la plante reprend sa croissance, pour finalement diminuer pendant la floraison (Malagoli *et al.*, 2005). C'est pour cette raison que les opérations de fertilisation sont appliquées pendant la phase de montaison/reproduction (figure 5). Le prélèvement efficace du N disponible dans le sol par les plantes est lié au fonctionnement de systèmes de transports à hautes et à basses affinités (respectivement HATS et LATS) avec des composantes constitutives ou bien inductibles pour chaque forme (figure 8). S'agissant du nitrate, les différentes catégories de transporteurs regroupent plusieurs centaines de gènes qui ont été rassemblés dans quatre familles : les Nitrate transporter 1



| | |
|--------------|---|
| GS1.1 | Remobilisation de N pendant la sénescence Translocation de N lorsqu'il est limitant Détermine le nombre, la taille et le remplissage des grains |
| GS1.2 | Assimilation du NH_4^+ par les racines Remobilisation de N pendant la sénescence Synchroniser avec GS2 pour l'assimilation de N |
| GS1.3 | Détoxification du NH_4^+ Assimilation de l'azote dans les graines |
| G2 | Réassimilation du NH_4^+ produit pendant la photosynthèse Assimilation du NH_4^+ à partir du NO_3^- dans les plastides |

Figure 9 : Principales étapes de transport et d'assimilation de l'azote chez les plantes (en haut). Le nitrate (NO_3^-) est réduit dans le cytosol en nitrite (NO_2^-) par la Nitrate Réductase (NR) qui produit également du monoxyde d'azote (NO). Le nitrite est transporté dans les chloroplastes pour être réduit en Ammonium (NH_4^+) par la Nitrite Réductase (NiR). L'ammonium cytosolique peut être transféré dans les chloroplastes ou bien être incorporé par la Glutamine Synthase 1 (GS1) dans la glutamine (Gln). L'Ammonium chloroplastique est intégré au glutamate (Glu) par le cycle Glutamine Synthase 2/ Glutamine Oxoglutarate Aminotransférase (GS2/GOGAT) à partir d'a-cétoglutarate (2-OG). Les différentes isoformes des GS sont impliquées dans des processus bien spécifiques associés à l'assimilation, la remobilisation ou la détoxification de l'ammonium cellulaire (en bas) (adaptée d'après Suarez *et al.*, 2002, Thomsen *et al.*, 2014 et Krapp, 2015).

and Peptide transporter Family (NPF), les Nitrate Transporter 2 (NRT2), les Chloride Channel (CLC) et les Slow Anion channel-Associated Homologues (SLAC/SLAH) (Krapp, 2015; O'Brien *et al.*, 2016; Tegeder et Masclaux-Daubresse, 2018). Chez l'espèce modèle *A. thaliana*, six transporteurs sont impliqués dans l'absorption du nitrate par les racines : deux LATS (NPF6.3 et NPF4.6) et quatre HATS (NRT2.1/2/4 et 5), les autres transporteurs ayant des rôles plus spécifiques dans la translocation du nitrate au sein de la plante (figure 8). Pour les autres formes de N, les transporteurs d'ammonium appartiennent à la famille des Ammonium Transporters (AMTs) et ceux des acides aminés aux sous-familles des Amino Acid Permeases (AAP), des Lysine/Histidine-like Transporters (LTH) et des Proline and Glycine Betaine Transporters (ProT). Néanmoins, pour la majorité des transporteurs, les fonctions intimes sont encore méconnues et dévoilent des mécanismes complexes qui, associés à des régulations très fines, montrent la nécessité pour la plante de pouvoir prélever le N de manière optimale. L'absorption du N n'est pas seulement dépendante des quantités présentes dans le sol, mais également de la qualité et de la performance des processus d'assimilation qui vont permettre son allocation et sa répartition adaptée à la croissance et au développement.

2.2. L'efficacité d'assimilation de l'azote

Les processus d'assimilation permettent d'incorporer le N inorganique aux molécules organiques du végétal (figure 9). Les formes inorganiques devenant rapidement toxiques, notamment l'ammonium, les processus d'absorption et d'assimilation sont étroitement régulés afin de limiter son accumulation dans les cellules. Les mécanismes d'absorption sont donc modulés par les mécanismes d'assimilation et inversement. Le N incorporé sous la forme de nitrate est réduit en nitrite (NO_2^-) dans le cytosol par la Nitrate Réductase (NR), transporté dans les chloroplastes par des transporteurs de la famille des His-Pro-Pro (HPP) et réduit à son tour en ammonium par la Nitrite Réductase (NiR) (Krapp, 2015). L'ammonium issu du nitrate, absorbé directement depuis le sol ou libéré en grande quantité par la photorespiration, est assimilé sous la forme de glutamine (Gln) puis de glutamate (Glu) par le cycle de la Glutamine Synthétase /Glutamine-2-Oxoglutarate Aminotransférase (GS/GOGAT). Il existe deux familles de GS (Thomsen *et al.*, 2014) : les GS1 et les GS2. Les GS1 sont localisées dans le cytosol et sont impliquées notamment dans l'assimilation de l'ammonium dans les racines et dans sa remobilisation pendant la sénescence foliaire. Les GS2 sont localisées dans les chloroplastes et interviennent dans l'assimilation de l'ammonium produit à partir du nitrate ainsi que dans la réassimilation

GS = 2.5 3.3-3.6 5.0 5.2 6.3 9.9

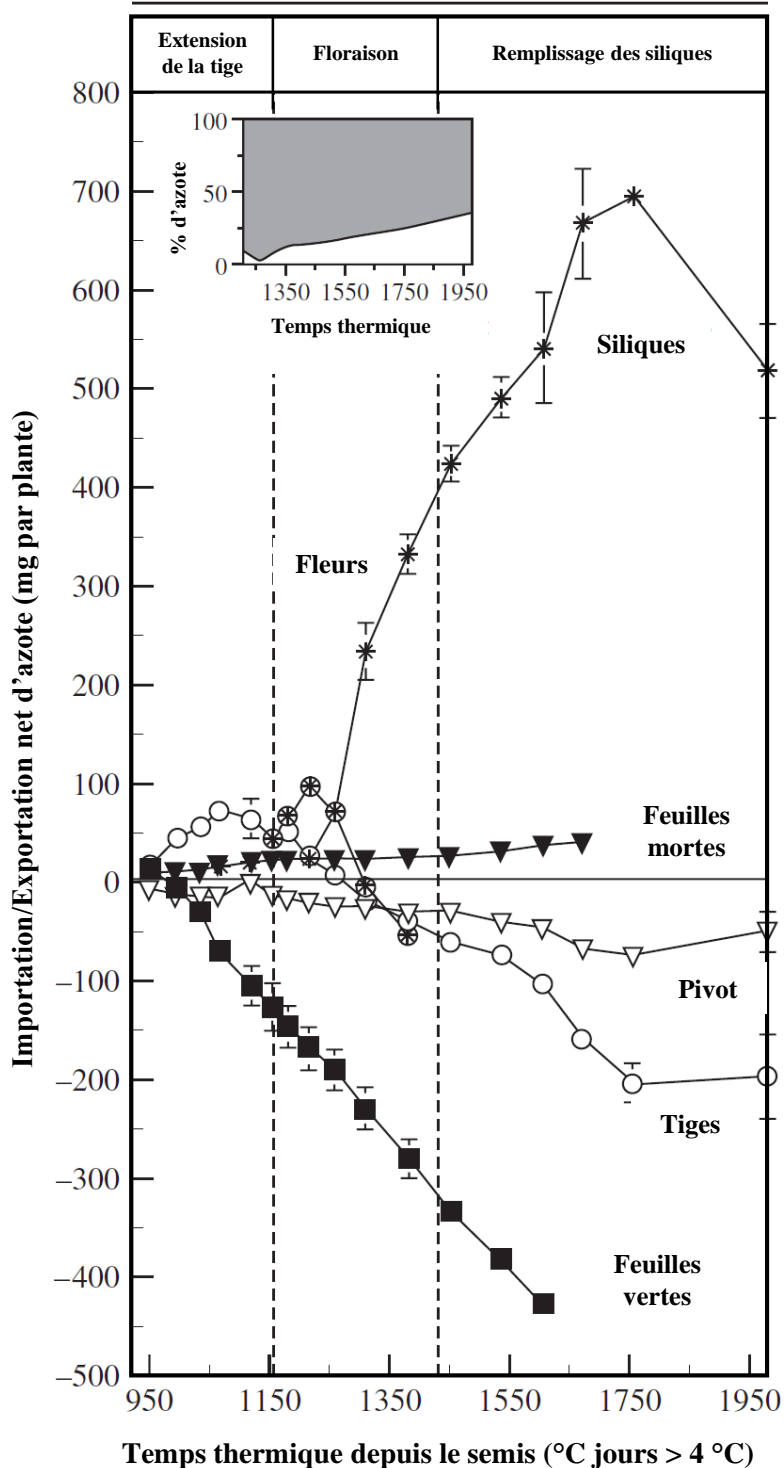


Figure 10 : Importation et exportation nettes d'azote (en mg par plante) dans les différents organes du colza (*Brassica napus* L. Capitot) depuis la reprise de la végétation et au cours de la reproduction. Les barres d'erreur indiquent la déviation standard pour 3 répétitions biologiques. Le graphique incrusté représente la proportion d'azote dans les siliques qui provient de l'absorption (en blanc) et de la remobilisation (en gris) (modifié d'après Malagoli *et al.*, 2005).

de l'ammoniaque (NH_3) produit par l'activité photorespiratoire (Wallsgrave *et al.*, 1987). Le Glu formé permet ensuite d'alimenter notamment la production des acides aminés et des acides nucléiques, ainsi que les voies de transports à longue distance via la Gln et l'asparagine (Asn). Plusieurs études ont montré qu'en modulant l'EAA, il est possible d'améliorer l'EAbA, notamment en intervenant sur l'incorporation de l'ammonium via les GS (Oliveira *et al.*, 2002; Thomsen *et al.*, 2014). Un autre moyen d'améliorer l'EAA est d'intervenir plus en aval dans les voies d'assimilation du N. Par exemple, l'alanine (Ala) est une forme d'azote facilement stockable chez les plantes, et l'augmentation de l'expression de l'Alanine AminoTransférase (AlaAT) permet d'augmenter l'absorption des nitrates par la plante et de diminuer l'impact d'une carence en N (Good *et al.*, 2007).

2.3. L'efficacité de remobilisation de l'azote

La valorisation optimisée du N par le colza dépend largement de sa capacité à réutiliser ou à remobiliser, au cours de son développement, les composés organiques azotés et ce d'autant plus pendant les phases où la disponibilité en N exogène devient limitante et les capacités d'absorption et/ou d'assimilation réduites. L'ERA se traduit par les capacités de conversion des composés azotés en formes disponibles/mobilisables, par les capacités de translocation à courte et longue distances de ces nutriments *via* les conduits phloémiens et par les propriétés de répartition et d'allocation de ces formes de transport vers des cheminements métaboliques adaptés. Chez le colza, les processus de remobilisation et de recyclage s'expriment aussi bien pendant la phase végétative, pour contribuer à la mise en place des jeunes organes photosynthétiques, que pendant la phase reproductrice pour parfaire la formation des organes reproducteurs et le remplissage des grains, à une période où le potentiel d'absorption racinaire du N est réduit. Malagoli *et al.* (2005), après incorporation initiale de ^{15}N , se sont intéressés à la répartition séquentielle du N dans les organes du colza au moment de la floraison afin d'évaluer les différents stocks et les échanges opérés entre les organes. Les principaux organes de stockage sont les feuilles et les tiges, les feuilles ayant les capacités de remobilisation et de transfert vers les siliques les plus élevées (figure 10). Néanmoins, une part importante de N résiduel est présente dans les tissus foliaires au moment de leur chute, ce qui peut représenter une perte potentielle de 11 à 60 % du N apporté. Il apparaît donc que les capacités de remobilisation du N organique foliaire ne sont pas optimisées et qu'elles s'ajustent à la quantité de N minéral apportée, absorbée et assimilée. Au stade de remplissage des graines, la mise à disposition de N organique doit être adaptée au transfert de composés carbonés

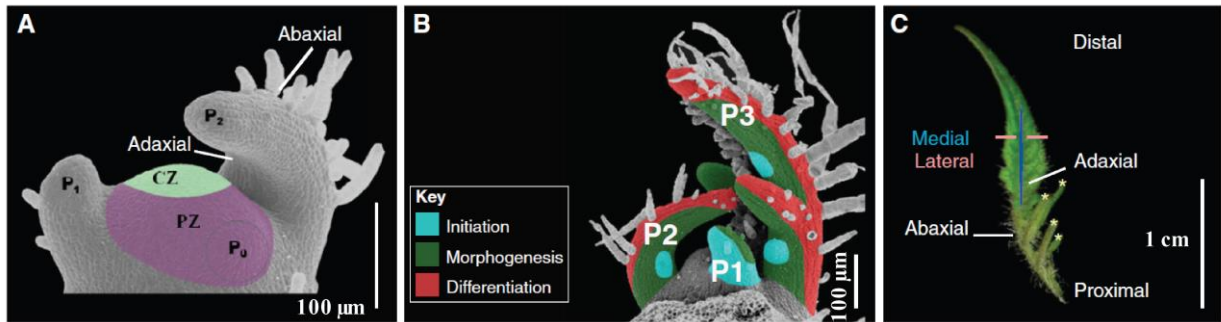


Figure 11 : Principaux stades de développement d'une feuille : (A) Microscopie électronique à balayage du méristème apical caulinaire (SAM) d'une feuille de tomate avec la zone centrale (CZ) qui est composée de cellules totipotentes, la zone périphérique (PZ) où sont initiés les organes/primordia (P1, P2 et P3). Les faces adaxiale et abaxiale sont montrées sur le primordium P2. (B) Représentation schématique des stades de développement d'une feuille. Les zones d'initiations sont indiquées en bleu, les zones de morphogénèse sont indiquées en vert et les zones de différenciation en rouge. (C) Axes de symétries sur une feuille en fin d'expansion (d'après Bar et Ori, 2014).

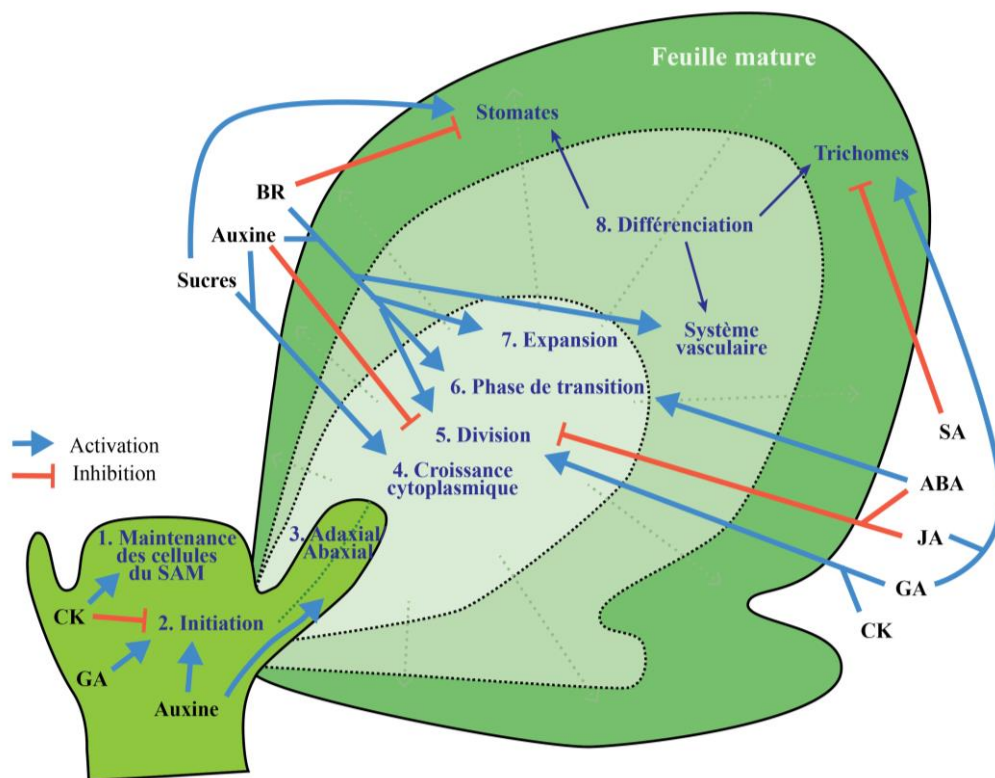


Figure 12 : Schéma simplifié des régulations phytohormonales qui opèrent pendant les principaux stades de croissance d'une feuille. L'initiation des primordia foliaires débute par la migration des cellules totipotentes depuis le méristème apical caulinaire (SAM) (1) vers la région périphérique (2). Les primordia acquièrent leur symétrie abaxiale/adaxiale (3) puis la transition vers la feuille mature suit 5 phases principales : (4) la croissance cytoplasmique, (5) la division cellulaire, (6) une phase de transition vers l'expansion (7) puis (8) la différenciation des différents tissus spécifiques (stomates, trichomes et système vasculaire) (modifiée d'après Kalve *et al.*, 2014).

indispensables à la formation et au stockage privilégié des lipides (Bilborrow *et al.*, 1993; Fazli *et al.*, 2005). Les processus de remobilisation et de recyclage du N organique depuis les parties végétatives de la plante sont largement dépendants de l'environnement nutritionnel, abiotique et biotique de la plante, mais généralement orchestrés par des événements qui relèvent du développement des tissus. En effet, la maturation et le vieillissement des organes photosynthétiques vont conditionner leur statut trophique et initier le phénomène de sénescence. C'est au cours de la sénescence que la machinerie cellulaire des tissus foliaires va être orientée vers des épisodes d'autophagie et de recyclage de ressources trophiques (Havé *et al.*, 2017).

3. La sénescence foliaire chez le colza

3.1. Morphogenèse et différenciation de la feuille

Le développement des organes foliaires suit une succession d'étapes relativement bien circonscrites, transposables à la quasi-totalité des espèces végétales (figure 11) (Foster, 1936; Efroni *et al.*, 2010; Bar et Ori, 2014). Ces étapes liées au développement et au vieillissement de la feuille sont rassemblées sous le terme Age-Related Changes (ARCs) (Jing *et al.*, 2005). Comme pour la plupart des processus développementaux, elles sont sous contrôle génétique et environnemental et assujetties à l'action et à l'interaction de nombreux facteurs moléculaires bien souvent sous régulation hormonale (figure 12) (Durbak *et al.*, 2012; Kalve *et al.*, 2014). Les premières étapes concernent l'initiation des primordia foliaires et la prolifération cellulaire localisée au niveau du méristème apical caulinaire (Bar et Ori, 2014). Les cellules entament alors le processus de différenciation et acquièrent peu à peu leurs fonctions métaboliques et physiologiques (photosynthèse, transport, protection, échange gazeux, etc.) (Gonzalez *et al.*, 2012). Elles s'allongent pendant la phase dite d'expansion et cette première période d'intense activité de construction métabolique s'établit dans une relation de dépendance trophique vis-à-vis de tissus sources sous-jacents. Ensuite, pendant la phase de maturité, les tissus vont progressivement devenir autonomes et passer d'un statut de « puits » à un statut de « source » (Gombert *et al.*, 2006). Autrement dit, ils vont fixer plus de carbone (C) et produire plus d'assimilats qu'ils n'en consomment, le surplus étant normalement dédié à l'alimentation des organes en croissance. Il est établi que la transition source/puits n'est pas brutale, qu'elle s'opère bien avant que les tissus foliaires aient atteint leur taille définitive et qu'à l'échelle du limbe, ces phases de transitions sont généralement zonales

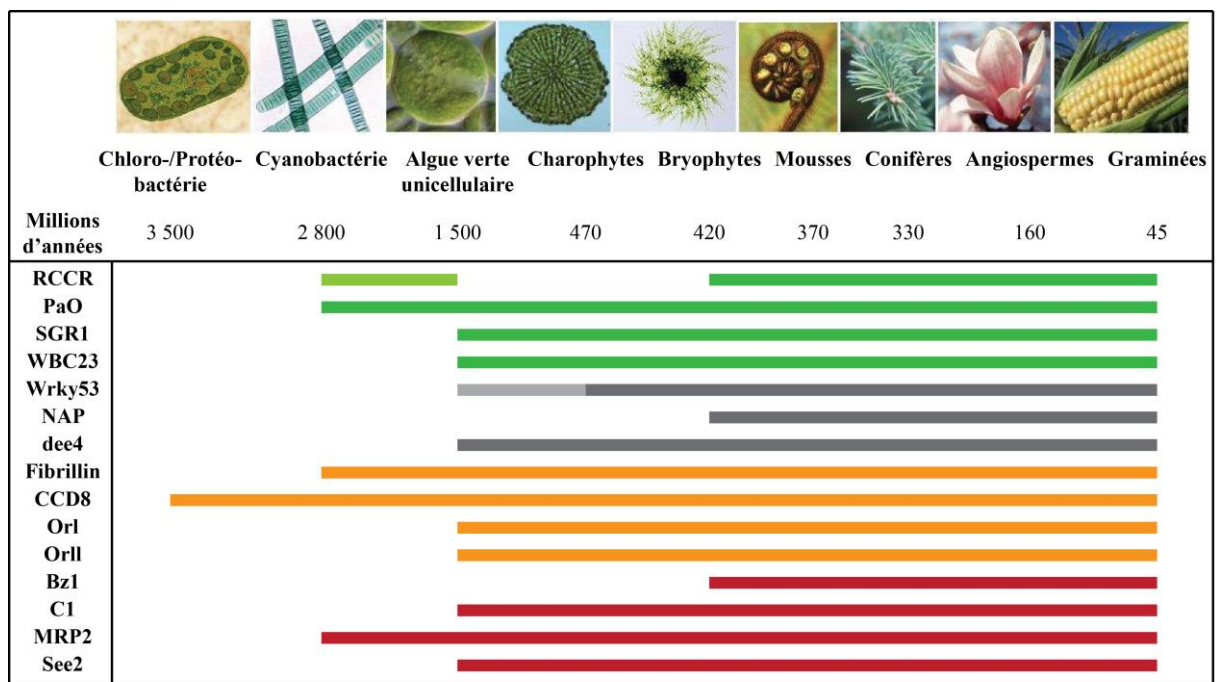


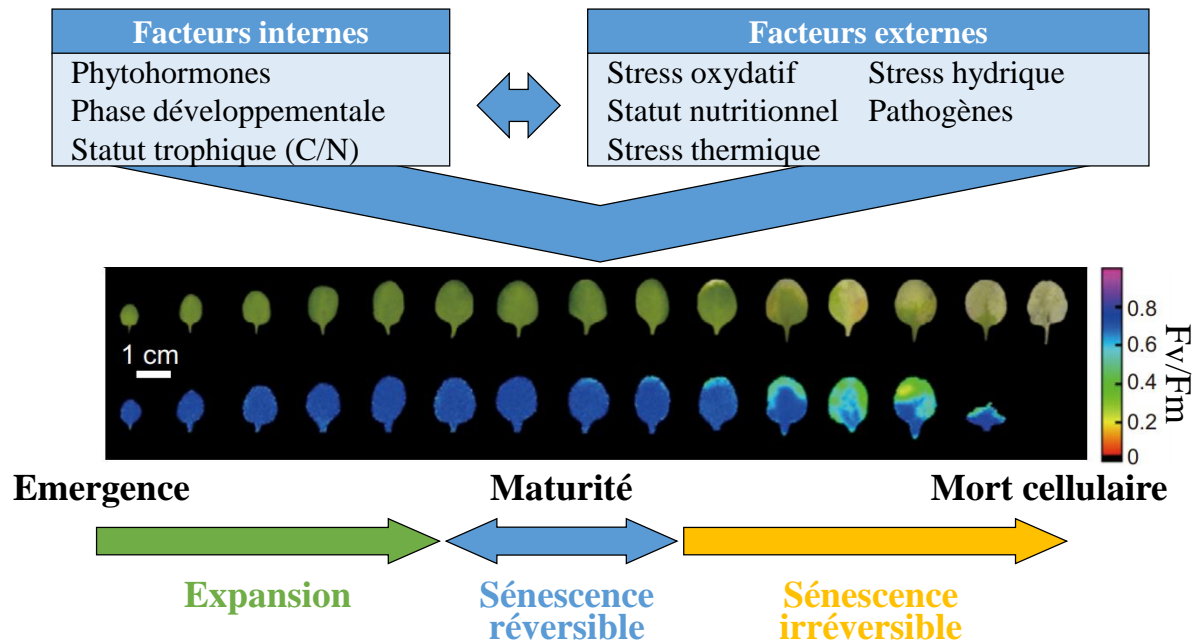
Figure 13 : Proposition de la chronologie évolutive des gènes impliqués dans la sénescence chez les végétaux. Les gènes sont colorés par groupe fonctionnel impliqué dans : la dégradation des chlorophylles (en vert), la spécialisation des tissus (en gris), la différenciation des plastes (en orange) et le fonctionnement des vacuoles (en rouge) (modifiée d'après Thomas *et al.*, 2008).

: la partie apicale et périphérique du limbe peut entamer des processus de recyclage alors que les parties basales et proches de la nervure centrale peuvent maintenir leur statut de puits (Turgeon, 1987). Ces phases de transition physiologique sont décrites par de nombreux ajustements morpho-anatomiques (Nguyen et McCurdy, 2015) et métaboliques orientés vers la production d'éléments remobilisables ou encore l'inversion des flux dans les tissus conducteurs (Turgeon et Webb, 1973; Meng *et al.*, 2001; Savage *et al.*, 2013). L'entrée en phase de sénescence des tissus foliaires est largement guidée par le développement général et coordonné du couvert, la phyllochronie, la phyllotaxie, l'architecture de la canopée et au final la disponibilité en ressources lumineuses. Chez le colza, le processus ultime d'évolution du programme de sénescence conduit généralement à la rupture des conductions trophiques et phloémiennes ainsi qu'à l'abscission et à la chute des feuilles (Guiboileau *et al.*, 2010).

3.2. Définition de la sénescence

Le terme de sénescence chez les plantes correspond aux différentes étapes qui précèdent la mort d'un organe. Ces étapes sont sous contrôle génétique et se traduisent par des modifications physiologiques, biochimiques et métaboliques dans les cellules de la plante. Les premières traces génétiques associées à la sénescence chez les végétaux sont retrouvées chez les algues unicellulaires, mais les premiers organismes à posséder l'ensemble des fonctions de sénescence retrouvées chez les plantes dites supérieures sont les Bryophytes (figure 13) (Thomas *et al.*, 2009). Ces processus ont été fortement sélectionnés pendant l'évolution et apportent un avantage sélectif essentiel pour les plantes. En effet, la sénescence permet le recyclage des nutriments et diminue la dépendance aux ressources extérieures, ce qui confère un avantage évolutif et adaptatif important. Les plantes pérennes et annuelles adoptent des stratégies de sénescence différentes pour assurer leur survie (Roach, 1993) : chez les plantes annuelles, les processus de recyclage sont majoritairement dirigés vers les organes reproducteurs, les organes végétatifs étant renouvelés chaque année, alors que les plantes pérennes doivent constamment allouer une partie des ressources au maintien et au développement des parties végétatives qui leur serviront pour l'année suivante. Parmi les principaux ARCs associés à la sénescence, la dégradation des chloroplastes qui entraîne une décoloration progressive des feuilles par perte des chlorophylles est bien connue (Singh et Anantha Rao, 1937). De nombreux autres événements sont programmés comme la dégradation des protéines par les protéases, l'activation des voies cataboliques de dégradation des acides

A : Les phases du développement de la feuille



B : La régulation de la sénescence par les phytohormones

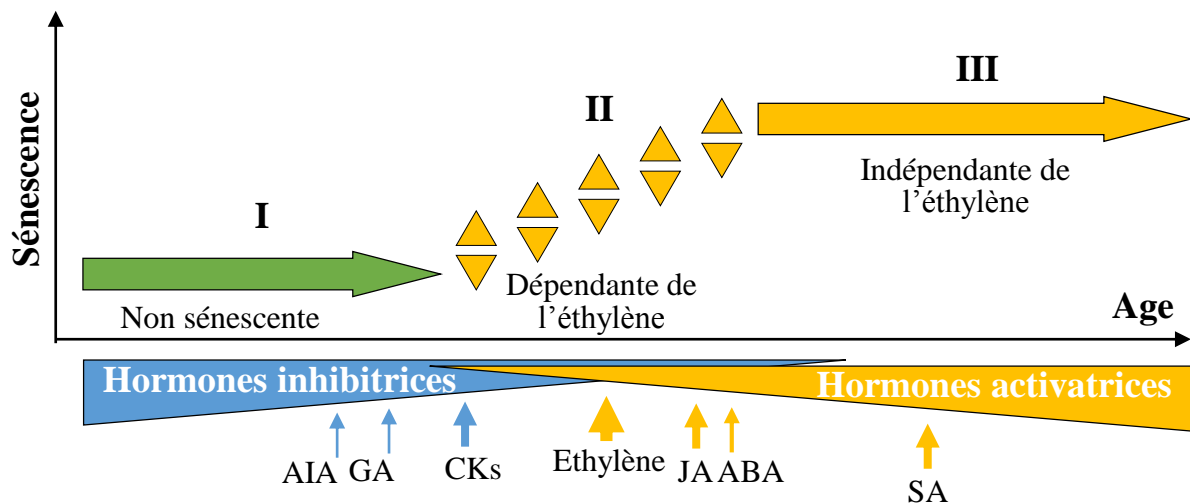


Figure 14 : Principaux facteurs internes et externes qui régulent les différentes étapes du développement de la feuille (A), ainsi que la régulation par les phytohormones de la sénescence (B). A : La phase d'expansion se traduit par la croissance de la feuille. Elle est suivie par la phase de maturité qui est associée à une efficacité maximale des photosystèmes (F_v/F_m) et à des phénomènes de sénescence réversibles. La phase de sénescence est caractérisée par une succession de processus de dégradation qui conduisent à la mort cellulaire. B : La première phase de la sénescence (I) se traduit par une insensibilité des tissus à l'éthylène associée à une diminution progressive de la sensibilité aux hormones inhibitrices (Auxine, GA : Gibbérellines et Cytokinines). La deuxième phase (II) est caractérisée par une sensibilité à l'éthylène et une augmentation progressive de la sensibilité aux hormones activatrices (Ethylène, JA : Jasmonate, ABA : Acide Abscisique et SA : Salicylate). La troisième phase est irréversible et indépendante de l'éthylène (modifiée d'après Guiboileau *et al.*, 2010, Woo *et al.*, 2013).

aminés, des acides nucléiques et des lipides ainsi que la mise en place de systèmes d'exportation des ressources, depuis les compartiments de réserves et le cytosol, vers les tissus conducteurs. Ces processus dégradatifs sont conditionnés à un maintien des fonctions énergétiques.

Les feuilles de colza sont sujettes à deux types de sénescence en fonction du stade de développement : (1) la sénescence séquentielle pendant la phase végétative et (2) la sénescence monocarpique pendant la phase reproductrice. Dans le premier cas, les feuilles vieillissantes vont entrer en sénescence pour alimenter les nouvelles feuilles en croissance et ainsi participer à la production de la biomasse. A ce stade, l'efficacité de la remobilisation va impacter la vitesse de croissance du colza et donc la mise en place de ressources disponibles à la fin du stade végétatif pour assurer le développement reproducteur. Dans le second cas, la majorité des feuilles va entrer en sénescence pour alimenter la production des organes reproducteurs et participer directement à l'élaboration du rendement.

3.3. Marqueurs et régulations de la sénescence foliaire

L'initiation et la durée des processus impliqués dans la sénescence foliaire doivent être finement régulés. En effet, un déclenchement trop tardif entraînerait la chute de la feuille avant que toutes les ressources soient exportées et un déclenchement trop précoce réduirait les capacités d'assimilation du C et du N de la plante. L'exposition à des conditions de stress biotiques ou abiotiques va largement interférer avec ces opérations séquentielles (Gombert *et al.*, 2006; Schippers, 2015). Les régulations moléculaires mises en oeuvre sont complexes et s'expriment aux niveaux épigénétiques, transcriptionnels, post-transcriptionnels, traductionnels et post-traductionnels (Ali *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2018; Yolcu *et al.*, 2018), dans un contexte cellulaire où des interactions étroites surviennent entre les organites (Woo *et al.*, 2016). De nombreux acteurs physiologiques, biochimiques et moléculaires ont pu être identifiés (Lim *et al.*, 2007; Bresson *et al.*, 2017). Il apparaît que l'initiation de la sénescence foliaire est associée à l'intégration de plusieurs signaux endogènes dont les phytohormones, les sucres, les espèces réactives de l'oxygène (ROS), le calcium (Lim *et al.*, 2007; Sobieszczuk-Nowicka, 2017) et les polyamines (Sobieszczuk-Nowicka, 2017). Ces éléments d'intégration sont en mesure d'agir, via des facteurs de transcription, sur l'expression de près de 6 500 gènes mis en évidence par l'étude du transcriptome chez *A. thaliana* (Breeze *et al.*, 2011) et référencés dans une base de données spécifique (Li *et al.*, 2017a). Dans le cas de la sénescence dite

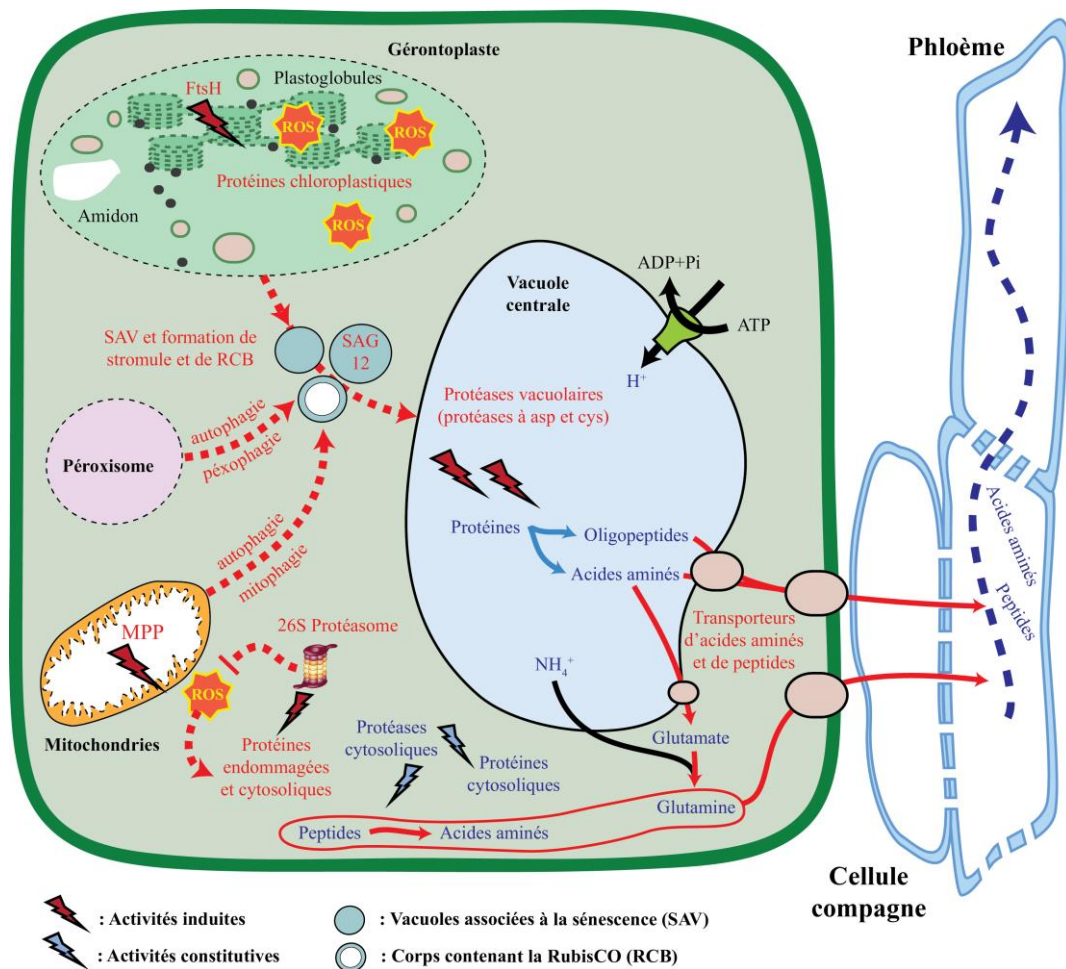


Figure 15 : Principaux évènements cellulaires associés à la remobilisation des composés azotés pendant la sénescence des cellules du mésophylle chez le colza. Les premiers évènements liés à la sénescence sont la dégradation des protéines du stroma chloroplastique (plus particulièrement la Rubisco) et des protéines associées aux membranes des thylakoïdes par FtsH. La dégradation des protéines impliquées dans la chaîne de transfert des électrons associée aux photosystèmes entraîne l'accumulation précoce d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui participent à la dégradation des protéines. La translocation des protéines plastidiales vers la vacuole centrale (riche en protéases) est réalisée par des voies spécialisées (SAVs : vésicules associées à la sénescence ; RCBs : corps contenant la Rubisco issue des voies d'autophagies). Plus tardivement, les chloroplastes se transforment en gérontoplastes avec de nombreux plastoglobules et les autres organelles sont également dégradées comme le montre l'activation du protéasome (la sous-unité beta A1 du protéasome 26S), d'une peptidase mitochondriale (MPP) et de SAG12 (protéases à cystéine localisée dans les vacuoles et les SAVs). La dégradation des mitochondries et des péroxisomes est associée aux voies d'autophagies (pexophagie et mitophagie). Les oligopeptides et les acides aminés résultant des processus dégradatifs sont ensuite transportés dans le cytosol, transformés en formes mobilisables, notamment en glutamine par la Glutamine Synthétase 1 (GS1) puis chargés dans le phloème pour alimenter les organes puits (d'après Avice et Etienne, 2014).

« développementale », c'est à dire qui résulte du vieillissement naturel de la feuille, les phytohormones jouent un rôle majeur et différentes études ont conduit à l'élaboration d'un modèle en trois phases (Jing *et al.*, 2002; Guiboileau *et al.*, 2010) (figure 14) : (1) une première phase qualifiée de non sénescence et non inductible, (2) une phase d'initiation inductible mais réversible et (3) une phase non-réversible. La première phase se traduit par une insensibilité des tissus aux phytohormones qui déclenchent la sénescence : l'éthylène, le jasmonate (JA), le salicylate (SA), l'acide abscissique (ABA), les brassinostéroïdes (BRs) et les strigolactones (SLs). Durant cette phase précoce, les tissus vont peu à peu acquérir leur capacité à entrer en sénescence, notamment par la diminution progressive de leur sensibilité aux hormones dites de croissance : l'auxine (IAA), les gibbérellines (GAs) et les cytokinines (CKs) et l'augmentation de leur sensibilité aux phytohormones dites de sénescence. La seconde phase est atteinte lorsque les tissus deviennent sensibles aux hormones de sénescence. Elle se traduit notamment par la mise en place de processus de sénescence réversibles qui sont liés à une balance entre les signaux activateurs et les signaux répresseurs (Guiboileau *et al.*, 2010). La troisième phase commence lorsqu'un signal active l'entrée en sénescence de manière définitive, comme l'éthylène chez *A. thaliana* (Jing *et al.*, 2002; Koyama, 2014). Cette dernière phase est irréversible et entraîne le déclenchement des processus de remobilisation, de dégradation et de translocation des ressources comme nous allons le voir par la suite.

3.4. Les processus de dégradation des composés azotés

La dégradation des ressources azotées dans les feuilles dépend de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires (figure 15). Dans le mésophylle des feuilles, jusqu'à 75 % du N est contenu dans les protéines chloroplastiques et plus particulièrement dans la Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygénase (RuBisCO) et les photosystèmes I et II (PSI et PSII) qui sont largement majoritaires dans le stroma et les thylakoïdes des chloroplastes (Peoples et Dalling, 1988; Hörtensteiner et Feller, 2002). Les gènes impliqués dans le démantèlement des chloroplastes sont activés précocement pendant la sénescence foliaire (Breeze *et al.*, 2011). Les protéases sont les enzymes responsables de la dégradation des protéines. Il y en a plus de 800 qui ont été identifiées dans le génome des plantes (Rawlings *et al.*, 2016) et elles sont regroupées en plusieurs familles en fonction de leur activité : les protéases à sérine (SPs), aspartique (APs), cystéine (CPs), métallo- (MPs) et thréonine (système ubiquitine/protéasome). Elles sont retrouvées dans tous les compartiments cellulaires et sont organisées en cinq classes suivant leur profil

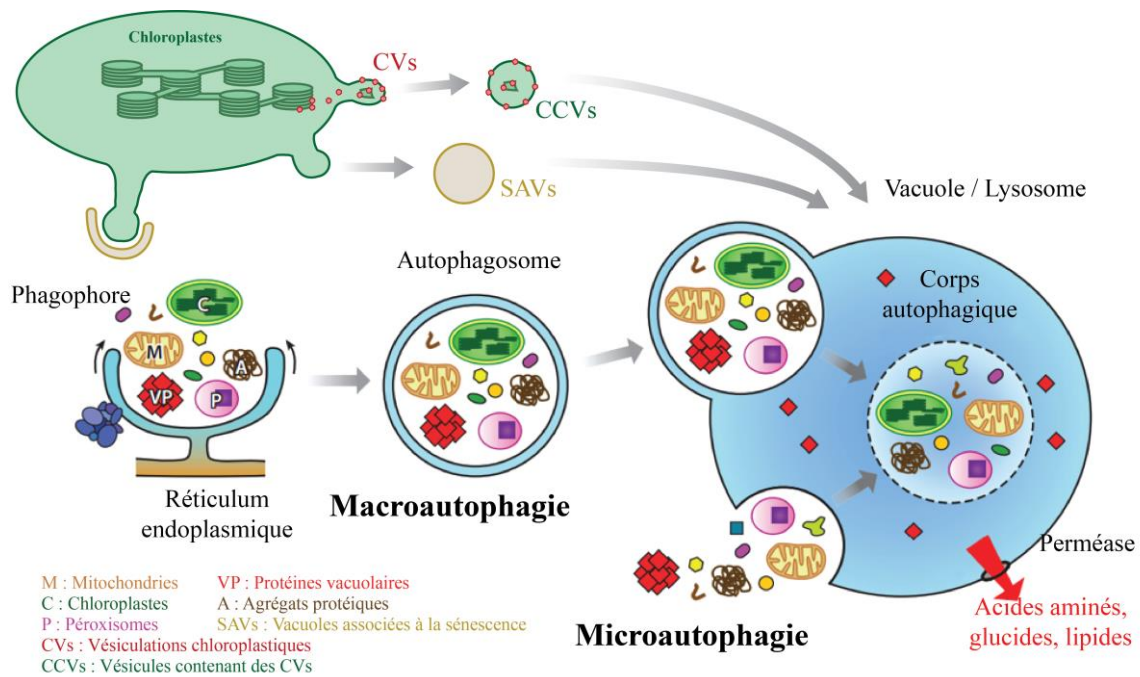


Figure 16 : Principales étapes associées à la dégradation des chloroplastes et aux processus d'autophagie chez les plantes. La microautophagie résulte dans l'absorption d'une portion du cytosol dans la vacuole par une invagination du tonoplaste. La macroautophagie débute par l'absorption d'une portion du cytosol par un phagophore puis par son absorption par la vacuole. Deux autres voies indépendantes sont représentées, les vésicules contenant des vésiculations chloroplastiques (CCVs) et les vacuoles associées à la sénescence (SAVs) dont les déterminants mécanistiques ne sont pas connus (adaptée d'après Otegui, 2017 et Marshall et Vierstra, 2018).

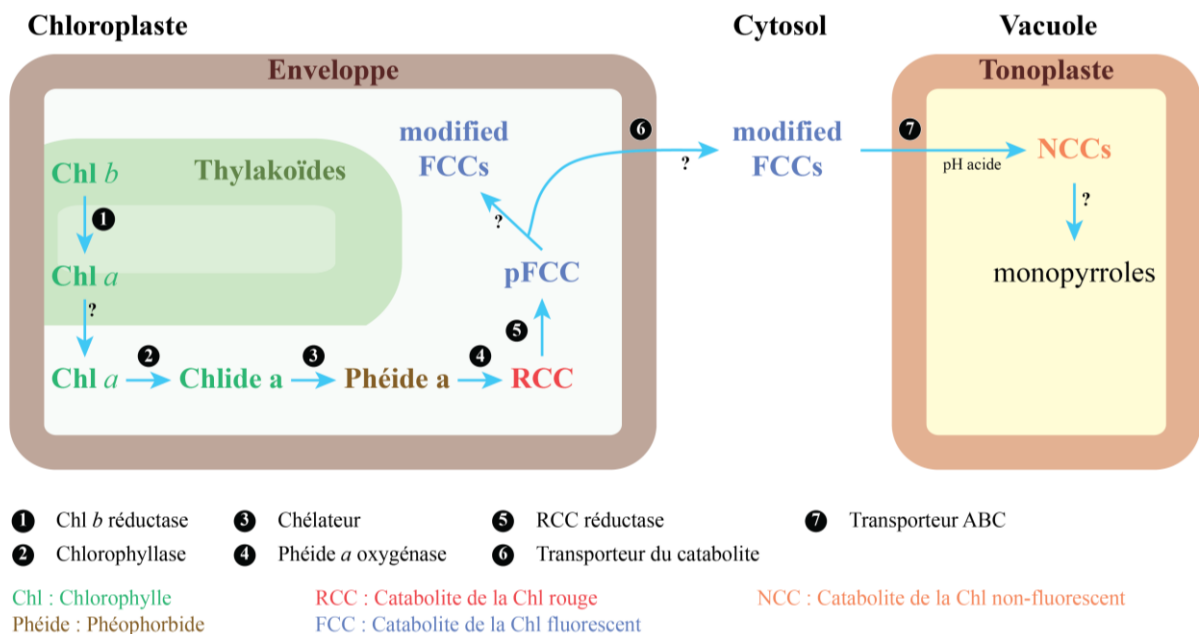


Figure 17 : Voies schématiques de dégradation des chlorophylles (Chl) dans les feuilles sénescentes. La Chl *b* est convertie en Chl *a* dans les thylakoïdes par la Chl *b* réductase (1). La Chl *a* est déphosphyllée par une chlorophyllase (2) puis le Mg²⁺ est chélaté par un composé non identifié pour former la phéophorbide *a* (3). Ensuite, le cycle porphyrinique est clivé par la phéophorbide *a* oxygénase (4) puis réduit par la RCC réductase (5). Les étapes finales de dégradation auraient ensuite lieu dans les vacuoles, mais les systèmes de translocation depuis les chloroplastes (6) et dans les vacuoles (7) ne sont pas connus (adaptée d'après Hörtensteiner, 2006).

d'expression pendant le développement foliaire et sont soumises à des régulations post-traductionnelles fines (Roberts *et al.*, 2012). Les protéases de classe 1 ont une expression stable au cours du développement et seraient indispensables au maintien des activités vitales pendant la sénescence (système du protéasome et le complexe Clp). Les protéases de classe 2 sont présentes à un niveau basal dans les tissus foliaires juvéniles puis induites à partir du point d'initiation de la sénescence (Subtilisin P2, quelques CPs des vacuoles et APs). Les protéases de classe 3 sont induites uniquement pendant la sénescence et auraient une implication plus tardive au cours des dernières phases du processus de vieillissement (Subtilisin P1, quelques CPs comme SAG12 et APs comme OsAsp1). Les protéases de classe 4 sont exprimées de manière transitoire pendant la sénescence et seraient impliquées dans les processus de dégradation précoces comme le démantèlement des chloroplastes (FtsH et ClpP2). Finalement les protéases de classe 5 ne sont exprimées que dans les jeunes feuilles et sont supposées agir comme inhibiteurs de la sénescence (ClpP4, ClpT1, FtsH1/5, Deg1/5 et 8). L'activité des protéases est étroitement liée aux mécanismes d'autophagie (Avila-Ospina *et al.*, 2014). Ce sont des processus intracellulaires, génétiquement contrôlés par les Gènes d'Autophagie (ATGs), qui permettent la dégradation et le trafic des composants cytoplasmiques vers les vacuoles (figure 16) soit : (1) directement *via* le tonoplaste (microautophagie) ou (2) par incorporation de vésicules lipidiques (les autophagosomes) formées dans le cytosol au tonoplaste (macroautophagie). Ils sont sollicités tout au long de la vie des cellules dans les processus de détoxification, de stockage ou de signalisation (Marshall and Vierstra 2018). La régulation des processus d'autophagie est complexe et la nature des autophagosomes évolue tout au long du développement cellulaire. Ils se déclinent en plusieurs types et sont régulés par des voies spécifiques en fonction des organelles et des composants cellulaires ciblés mais également en fonction des stress biotiques et abiotiques (Marshall and Vierstra 2018). Pendant la sénescence, les processus d'autophagie sont particulièrement sollicités pour dégrader les compartiments subcellulaires, les macromolécules et les protéines (Avila-Ospina *et al.*, 2014). Il existe également deux autres voies de dégradation, indépendantes de l'autophagie (figure 16) : (1) les « vacuoles associées à la sénescence » (SAVs) qui sont acides et abritent une activité protéolytique intense impliquée dans la dégradation des GS2 et de la RuBisCO notamment (Martínez *et al.*, 2008) et (2) les vésicules contenant des vésiculations chloroplastiques (CCVs) impliquées dans la déstructuration des thylakoïdes (Wang and Blumwald 2014).

Parallèlement à la mise en oeuvre des activités protéolytiques, d'autres processus cataboliques sont initiés. C'est le cas notamment de la mise en place de la voie de

Cellule du mésophylle

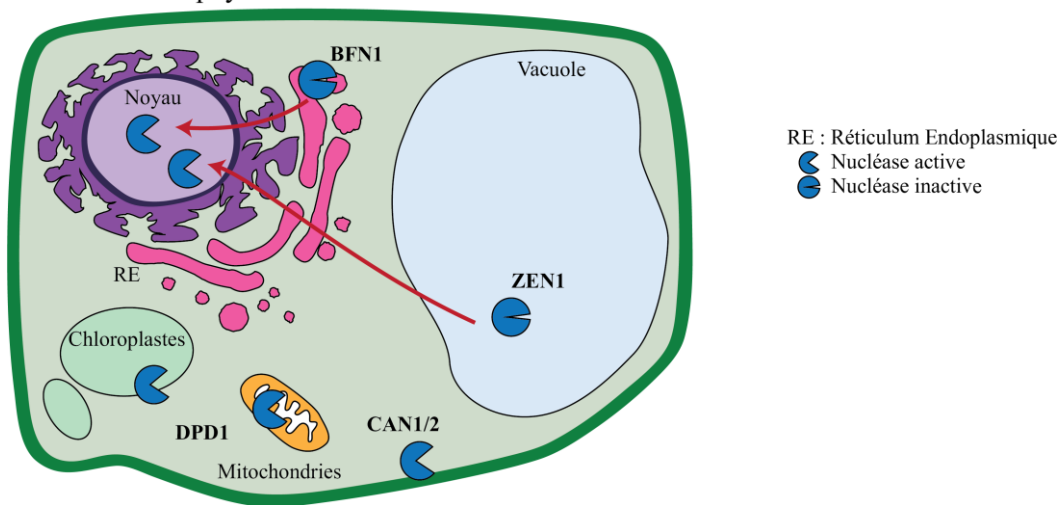


Figure 18 : Localisation cellulaire des nucléases induites pendant la sénescence dans une cellule du mésophylle. BFN1 (*A. thaliana*) et ZEN1 (*Zinnia*) sont des endonucléases localisées respectivement dans le réticulum endoplasmique (RE) et la vacuole. La dégradation des membranes pendant la sénescence leur permettrait d'accéder au noyau et de dégrader l'ADN. CAN1/CAN2 (*A. thaliana*) sont des endonucléases probablement localisées sur la membrane plasmique par myristoylation et palmitoylation de leur extrémité N-terminal. DPD1 (*A. thaliana*) est une exonucléase transportée à la fois dans les mitochondries et les chloroplastes qui ciblerait les ADNs mitochondriaux et chloroplastiques (adaptée d'après Sakamoto et Takami, 2014).

dégradation des chlorophylles, qui contiennent environ 2 % du N cellulaire (Peoples et Dalling, 1988). Si le gain en ressources n'est pas majeur, sur le plan du recyclage du N, il semblerait que les assemblages provoqués entre ces chlorophylles et des complexes protéiques comme les « Light-Harvesting Complexes » (LHC) par exemple, préviendraient leur dégradabilité. La dégradation des chlorophylles (figure 17) débute dans les chloroplastes par déphytylation par une chlorophyllase puis déchelation du Mg^{2+} via un cofacteur non-identifié, et enfin par le clivage du cycle porphyrinique initié par la phéophorbide a oxygénase (Hörtensteiner, 2006). Les étapes finales de dégradation auraient ensuite lieu dans les vacuoles, mais les systèmes de translocation n'ont pas encore été identifiés (Hörtensteiner, 2006).

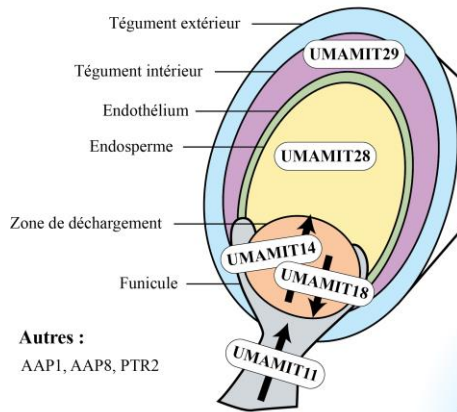
Bien que moins documentée, la contribution des acides nucléiques au recyclage du N et du P n'est sans doute pas négligeable. Quelques travaux semblent indiquer que des nucléases spécifiques interviennent pendant la sénescence et seraient responsables de la dégradation des ARNs et ADNs, bien que les mécanismes de régulations ne soient pas encore connus (figure 18) (Sakamoto and Takami 2014). En effet, une diminution du contenu en ARNs et ADN est observée pendant la sénescence (Dyer et Osborne, 1971; Krul, 1974) en parallèle d'une augmentation de l'expression de 14 endonucléases et 2 exonucléases (Sakamoto et Takami, 2014). Par exemple la Bi-Functional Nuclease 1 (BFN1) qui a une double activité désoxyribonucléase et ribonucléase (DNase/RNase) serait induite pendant la sénescence chez *A. thaliana* (Pérez-Amador *et al.*, 2000). En outre, BFN1 est sous le contrôle du facteur de transcription ORESARA1 (ORE1) qui est l'un des régulateurs essentiels de la sénescence (Matallana-Ramirez *et al.*, 2013).

Ces mécanismes de dégradation vont permettre, d'une part, d'alimenter le métabolisme énergétique et, d'autre part, de pourvoir à la production des composés mobiles qui seront exportés vers les organes « puits » et nécessitent la mise en oeuvre de voies adaptées, dans le temps et dans l'espace, d'allocation de ces ressources carbonées et azotées (sans compter la ré-allocation de S, P et des autres nutriments minéraux).

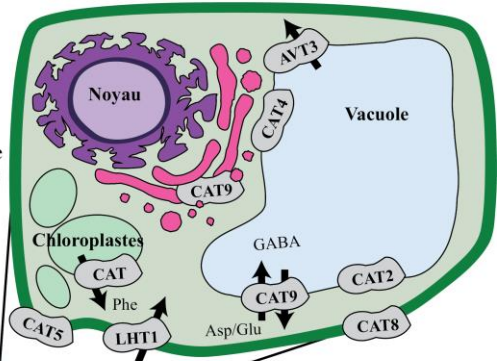
3.5. Les mécanismes de transport des composés azotés

Les formes mobiles de N organique chez les plantes sont les acides aminés libres, les peptides et les uréides, ces derniers étant plutôt retrouvés dans le cadre d'associations symbiotiques fixatrices de diazote (Tegeeder, 2014). Les formes inorganiques sont l'ammonium et le nitrate. La dégradation massive des protéines va alimenter le pool de

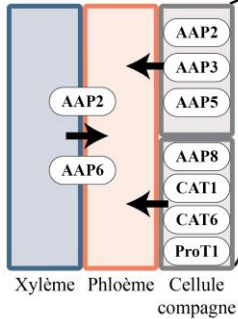
Développement de la graine



Transport intracellulaire



Chargement du phloème



Export du phloème vers les racines

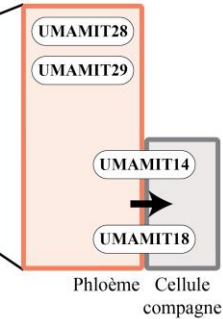


Figure 19 : Rôle et localisation des principaux transporteurs d'acides aminés caractérisés chez les plantes dans le développement de la graine, les transports intracellulaires, le chargement du phloème au niveau des feuilles, les transferts entre le xylème et le phloème ainsi que dans l'export depuis le phloème vers les racines. Les flèches représentent la direction des transports lorsque celle-ci est connue (adaptée d'après Tegeder et Rentsch, 2010 et Dinkeloo *et al.*, 2018).

peptides et d'acides aminés libres dans les cellules et peut également donner lieu à la production d'ammonium. Ces formes de N sont, au moins en partie, exportées vers d'autres tissus et doivent être converties en formes mobilisables vers les tissus conducteurs depuis leur compartiment d'origine pour être chargées dans le phloème.

En fonction des espèces, l'Asn (Rochat et Boutin, 1991) et la Gln (Byrne et Miller, 1990; Corbesier *et al.*, 2002; Chaffei *et al.*, 2004; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006) sont les formes de transport majoritairement retrouvées dans le phloème chez le pois, la tomate, le colza et *A. thaliana*. Cependant, plusieurs études ont rapporté de fortes proportions de Glu chez l'orge, le blé et l'épinard (Riens *et al.*, 1991; Winter *et al.*, 1992; Dinant *et al.*, 2010), de Ser chez l'avoine (Weibull *et al.*, 1990), de Gly chez le maïs (Hayashi et Chino, 1986) ou encore de Pro chez le brocoli et l'oranger (Pate, 1973; Hijaz et Killiny, 2014). La composition du phloème est particulièrement fluctuante et s'adapte au statut trophique de la plante, à son stade de développement, à la nature des tissus sources, aux conditions environnementales (Girousse *et al.*, 1996; Pate *et al.*, 1998) et peu varier en fonction de la méthode d'évaluation de la composition du phloème, dont le prélèvement est souvent délicat et source de variations (Hijaz et Killiny, 2014). La contribution des formes inorganiques à la remobilisation des ressources azotées est assez peu documentée malgré la présence de transporteurs spécifiquement exprimés pendant la sénescence foliaire. Chez le colza, contrairement à ce qui se passe chez *A. thaliana*, le nitrate est généralement très faiblement accumulé et sa contribution au recyclage du N pendant la sénescence est probablement négligeable. La production régulée de Gln et de Glu (Hildebrandt *et al.*, 2015) paraît constituer une orientation majeure du recyclage des acides aminés d'origine protéolytique comme semblent le confirmer les expressions induites de la GS1 et de la GOGAT dans des feuilles sénescentes, notamment chez le tabac (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006). Le transport des acides aminés entre les compartiments subcellulaires et dans le phloème est assurée par des transporteurs de la famille des « Usually Multiple amino Acids Move In and out Transporters » (UMAMITs) et de la superfamille des Amino Acid-Polyamine-Choline Facilitator (APCs) avec une centaine de membres identifiés chez les végétaux (Tegeder, 2012; Pratelli et Pilot, 2014). Les transporteurs sont associés à des processus et à des compartiments subcellulaires spécifiques, comme CAT5 et CAT8 de la sous famille des transporteurs d'acides aminés cationiques (CATs) qui sont localisés au niveau de la membrane plasmique alors que CAT2 est localisé au niveau du tonoplaste de certaines vacuoles (Su *et al.*, 2004). Un certain nombre de gènes codant des transporteurs sont induits spécifiquement pendant la sénescence chez plusieurs espèces végétales (Guo *et al.*, 2004; Gregersen et Holm, 2007; Zhang *et al.*, 2014) et sont très probablement

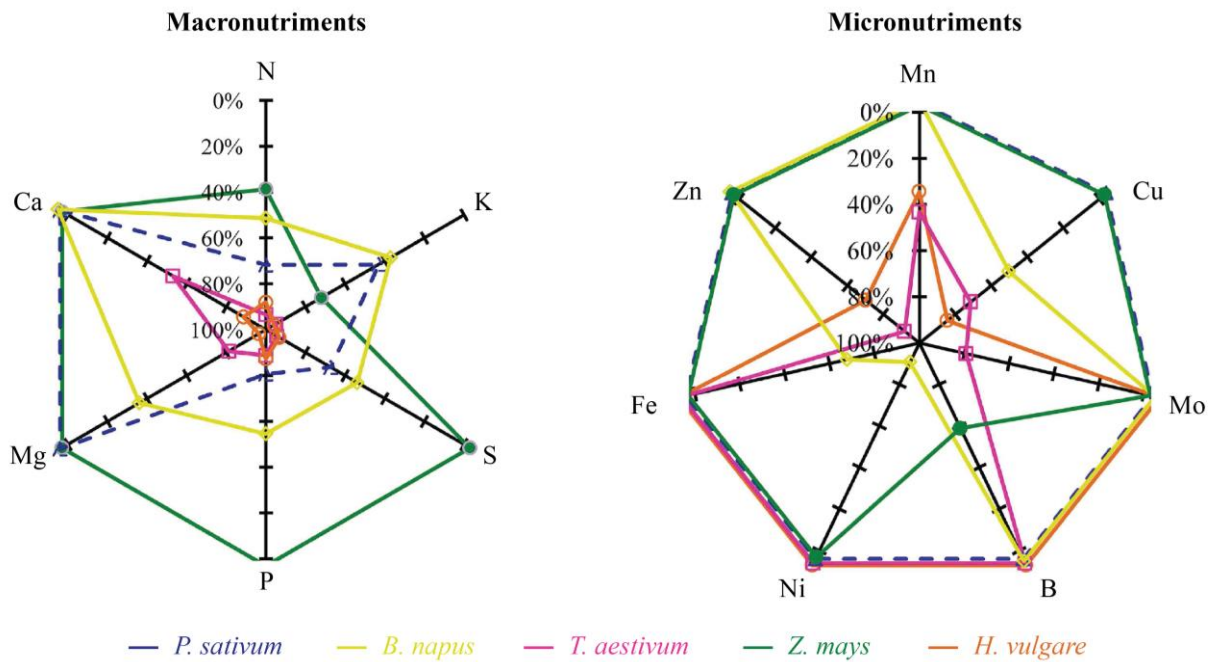


Figure 20 : Remobilisation apparente des micro- et macro-nutriments minéraux exprimée en pourcentage par rapport au contenu maximum observé pendant la sénescence des feuilles de cinq espèces cultivées (adaptée d'après Maillard *et al.*, 2015).

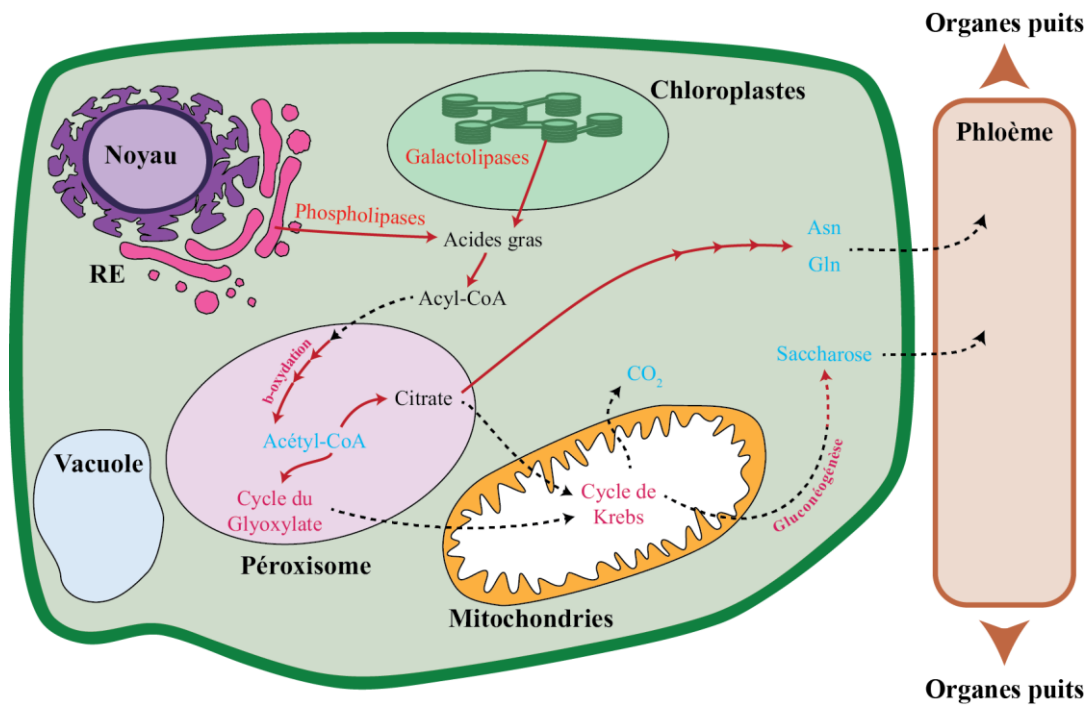


Figure 21 : Principales phases et principaux acteurs de la dégradation des lipides pendant la sénescence foliaire. Les galactolipases et phospholipases libèrent des acides gras à partir des glycolipides et phospholipides dans les chloroplastes, le réticulum endoplasmique (RE) ou à partir des autres membranes. Après activation en Acyl-CoA, la b-oxydation dans le péroxysome permet la production de l'intermédiaire principal : l'Acétyl-CoA. Il y a ensuite trois voies cataboliques possibles : (1) via le cycle de Krebs par le Citrate, (2) via le cycle du Glyoxylate qui conduit potentiellement à la production de saccharose exportable et (3) la conversion en Glutamine et Asparagine à partir du citrate qui peuvent être exportés vers le phloème. Les réactions enzymatiques sont représentées par des flèches rouges et le transport ou la diffusion par des flèches noires (d'après Troncoso-Ponce *et al.*, 2013).

impliqués dans la translocation et la remobilisation des acides aminés. Malgré les avancées récentes sur la caractérisation fonctionnelle de ces transporteurs (figure 19) (Tegeder and Rentsch 2010; Dinkeloo *et al.*, 2018), les mécanismes de translocation, la localisation ainsi que les voies de régulations restent encore mal compris.

3.6. La remobilisation des autres composés

Si le N et le C sont les principaux éléments remobilisés pendant la sénescence foliaire, ils ne sont pas les seuls (figure 20). La plupart des macronutriments sont très mobiles dans le phloème (P, S, K et Mg) alors que les micronutriments le sont moins (Fe, Zn, Cu, B, Mo, Cl et Ni), le Ca étant le seul élément qui s'accumule tout au long du développement des feuilles (Maillard *et al.*, 2015). Les capacités de remobilisation de ces nutriments, comme pour l'azote, dépendent en partie de leurs formes moléculaires. Elle va déterminer le nombre d'étapes et le coût métabolique nécessaire pour les convertir en formes mobilisables via le phloème. Certains métabolites sont piégés dans des structures inertes et ne pourront pas être remobilisés, par exemple les constituants des parois cellulaires (Himmelblau and Amasino 2001). Pour chaque élément, il y a une variabilité assez forte en fonction des espèces et chez le colza, il semble que le Zn, Mn, Mo et B en plus du Ca ne soient pas ou très peu remobilisés (Maillard *et al.*, 2015).

Le C est remobilisé à hauteur de 30 % pendant la sénescence foliaire (d'après Havé *et al.*, 2017). La majeure partie du C cellulaire est présent sous deux formes : les sucres et les lipides. La majeure partie des sucres a un rôle structural dans la composition de la paroi cellulaire et reste inerte et indisponible. Une autre fraction sert au stockage (amidon) et au transport d'énergie à courte (glucose et fructose) et longue (saccharose) distance. Ces formes sont mobilisables et ciblées pendant la sénescence foliaire. En effet, l'amidon est dégradé de manière précoce, augmentant le pool d'hexoses (glucose et fructose) dans les tissus qui agirait comme signal dans le déclenchement de la sénescence (Wingler *et al.*, 2006). Les hexoses sont ensuite convertis en saccharose et transportés via le phloème dans les organes puits grâce à des transporteurs spécialisés des familles SUC et SWEET (Williams *et al.*, 2000; Eom *et al.*, 2015). Les hexoses peuvent également servir de substrat énergétique, mais il semblerait que pendant la sénescence, les lipides soient la source privilégiée d'alimentation des processus énergétiques (Yang et Ohlrogge, 2009). Les lipides servent de réserve mais sont également des composants essentiels des membranes cellulaires. Pendant la sénescence, le démantèlement des chloroplastes est associé à une activation des voies de dégradation des lipides (figure 21). Par exemple, chez *A. thaliana*,

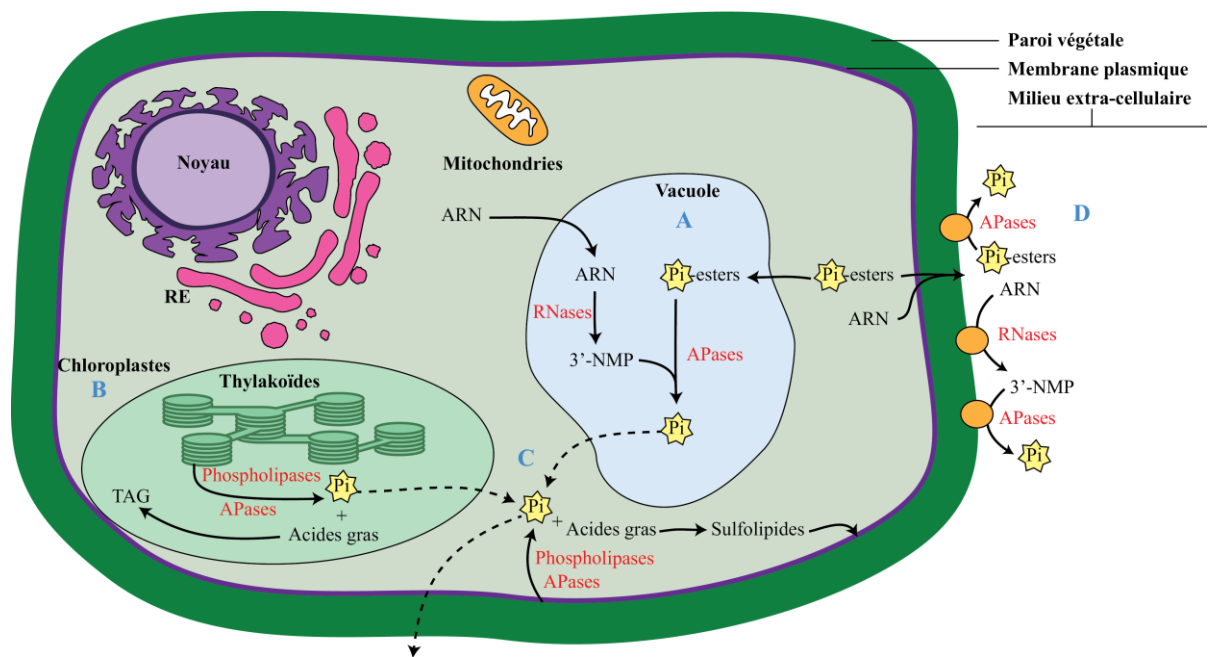


Figure 22 : Principales voies de remobilisation du phosphate inorganique (Pi) dans les cellules sénescents. Les ARNs et les esters de Pi sont dégradés dans la vacuole (A) par des RNases et des Phosphatases Acides (APases). Les membranes des thylakoïdes (B) sont dégradées par des phospholipases qui, conjointement avec des APases, libèrent du Pi et des acides gras, ces derniers étant séquestrés sous la forme de Triacylglycérol (TAG). De la même manière, l'intégrité de la membrane plasmique est altérée pendant la sénescence (C), les Phospholipases et les Apases permettent le relargage de Pi et d'acides gras, dont certains sont réincorporés à la membrane plasmique sous la forme de sulfolipides. Les oligonucléotides et les esters de Pi dans le cytosol peuvent être exportés vers l'espace extracellulaire (D) où ils sont hydrolysés par des RNases et des APases (adaptée d'après Stigter et Plaxton, 2015).

la sénescence est associée à une expression accrue des gènes codants 11 lipase/acyl hydrolases, 6 phospholipases, 2 lipoxygénases, et 9 enzymes impliquées dans la bêta-oxydation des acides gras, en parallèle d'une diminution de 83 % du contenu lipidique (Yang et Ohlrogge, 2009). La dégradation des phospholipides libère également du phosphate et produit majoritairement de l'acétyl-CoA mais aussi d'autres produits de dégradation en fonction de leur nature. Par exemple les composants majoritaires des membranes de thylakoïdes sont les galactolipides et leur dégradation produit du galactose, de l'acétyl-CoA qui alimente ainsi directement le cycle de Krebs pour produire de l'énergie et a aussi vocation dans ce contexte de recyclage à assurer la synthèse de glucose via la néoglucogénèse (Buchanan-Wollaston, 1997).

Le P est le deuxième composé le plus remobilisé pendant la sénescence foliaire, à hauteur de 50 % (Veneklaas *et al.*, 2012). Il est essentiel au stockage et au transfert d'énergie dans les cellules sous la forme d'orthophosphate inorganique (Pi), d'esters organophosphatés (ATP, ADP, AMP, NADP, acides nucléiques, etc) et de lipides (glycérophospholipides) (figure 22) (Stigter and Plaxton 2015). La majorité du P cellulaire est contenu dans les acides nucléiques (de 40 à 60 %) sous la forme d'ARNs (85 %) et d'ADNs (15 %) (Bialeski, 1968; Tachibana, 1987). Pendant la sénescence foliaire, les ARNs sont dégradés par des RNases spécifiques comme RNS1 et RNS2 chez *A. thaliana* (Taylor *et al.*, 1993; Bariola *et al.*, 1999) ou encore LX S-like RNase chez *L. esculentum* (Lers *et al.*, 2006). Puis, les phosphatases appartenant à la famille des Purple Acid Phosphatases (PAPs) vont libérer le Pi des acides nucléiques libres et des autres esters organophosphatés, comme PAP26 et PAP17 chez *A. thaliana* (De Leo et Sacher, 1970; Robinson *et al.*, 2012). Le Pi est ensuite transporté vers le phloème (Bialeski, 1969) et pris en charge par des transporteurs spécifiques de type « Phosphate Transporter » (PT) comme PhPT1 (Mudge *et al.*, 2002; Chapin et Jones, 2009).

Le S est un composé essentiel qui entre notamment, sous forme réduite ou oxydée dans la composition de la Cys, la Met, les sulfolipides et les glucosinolates. Chez la plupart des espèces végétales, la forme remobilisable la plus abondante est le glutathion, mais des variantes sont identifiées selon les espèces. Par exemple chez le soja, l'homoglutathion est la forme privilégiée (Sunarpi et Anderson, 1997), alors que chez les *Brassicaceae*, le S-methyl Cysteine Sulphoxide (SMCSO) et les glucosinolates peuvent être également transportés par le phloème, bien que leur contribution précise au transport global du soufre ne soit pas connue (Clossais-Besnard et Larher, 1991; Chen *et al.*, 2001).

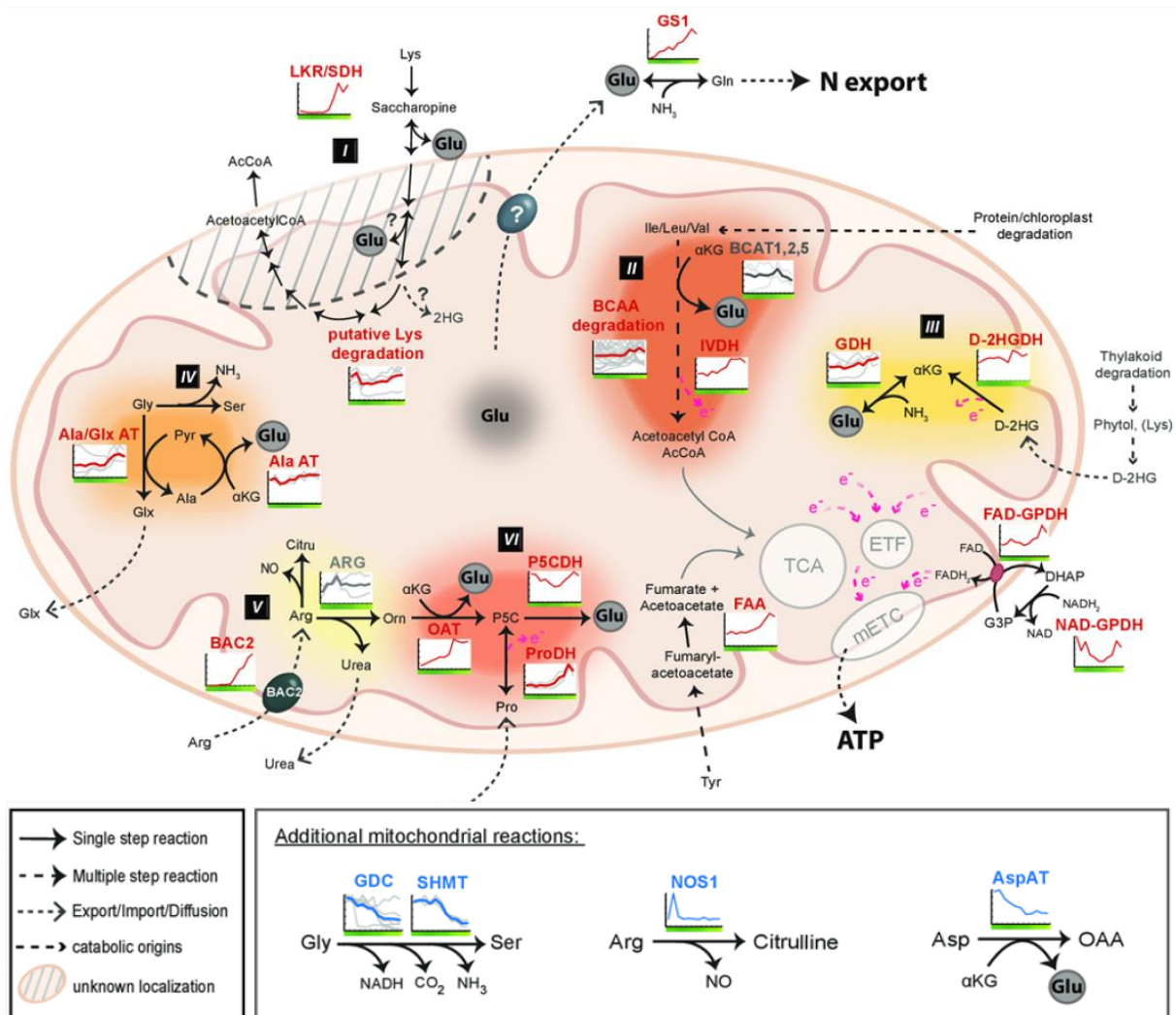


Figure 23 : Evolution de la quantité de transcrits associés à la dégradation de (I) la lysine, (II) des acides aminés à chaînes ramifiées ainsi qu’au métabolisme (III) du D-2HG, (IV) de la glycine et de l’alanine, (V) du cycle de l’urée et (VI) de la proline pendant la sénescence foliaire chez *A. thaliana*. Les gènes associés à ces voies métaboliques ainsi que leurs niveaux d’expression sont représentés ici. La production d’équivalent réducteur est représenté par une flèche et un électron (e⁻) (Stigter et Plaxton, 20015).

AcCoA : Acetyl CoA, **Ala** : Alanine, **AlaAT** : Alanine aminotransferase, **Ala/GlxAT** : Alanine/Glyoxylate aminotransferase, **ARG** : Arginase, **AspAT** : Aspartate aminotransferase, **BCAT** : Branched chain amino acid transaminase, **Citru** : Citrulline, **FAA** : Fumarylacetoacetate, **FAD-GPDH** : FAD-dépendante glycerol-3-phosphate déhydrogénase, **Fum** : Fumarate, **GDC** : Glycine décarboxylase, **GDH** : Glutamate déhydrogénase, **Glx** : Glyoxylate, **GS** : Glutamine synthase, **IVDH** : Isovalérate déhydrogénase, **LKR/SDH** : Lysine-Ketoglutarate réductase/saccharopine déhydrogénase, **mETC** : mitochondrial electron transfer chain, **NAD-GPDH** : NAD-dépendant glycerol-3-phosphate déhydrogénase, **NOS1** : Nitric oxide synthase, **NO** : Nitric oxide, **OAT** : Ornithine-delta-aminotransferase, **ProDH** : Proline déhydrogénase, **P5C** : Pyrroline-5-carboxylate, **P5CDH** : Pyrroline-5-carboxylate déhydrogénase, **Pyr** : Pyruvate, **SHMT** : Serine hydroxymethyl transferase, **TCA** : Cycle des acides tricarboxyliques, **D-2HG** : 2-hydroxyglutarate, **D-2HGDH** : D-2-hydroxyglutarate déhydrogénase, **αKG** : a-ketoglutarate.

Le K est un composé très mobile dans le xylème et le phloème. Le K joue de nombreux rôles dans l'homéostasie chimio-osmotique et électrique des cellules végétales, la régulation d'activités enzymatiques ainsi que dans l'ouverture et la fermeture des stomates. Les transporteurs de potassium font partie d'une famille multigénique avec beaucoup de redondance fonctionnelle (Grabov, 2007; Adams et Shin, 2014). Plusieurs espèces remobilisent le K pendant la sénescence, mais les mécanismes précis sont peu connus et difficiles à appréhender puisqu'il peut diffuser plus ou moins librement à travers plusieurs catégories de transporteurs non spécifiques et au travers des membranes perméabilisées, comme c'est le cas pendant la sénescence (Maillard *et al.*, 2015).

3.7. Les processus énergétiques associés à la sénescence

Au cours de la sénescence foliaire, le démantèlement des chloroplastes va modifier singulièrement le statut énergétique et redox des cellules. En effet, les chloroplastes perdent leur capacité à produire du pouvoir réducteur et de l'ATP via la photosynthèse, ce qui va conduire à une reconfiguration des voies de production d'énergie au niveau du peroxyosome et des mitochondries. Le peroxyosome est responsable, entre autre, de la dégradation des acides gras en Acetyl-CoA qui seraient la source privilégiée d'énergie pendant la sénescence foliaire (Yang et Ohlrogge, 2009). Le rôle des mitochondries et du peroxyosome pendant la sénescence est complexe, puisqu'elles produisent à la fois de l'énergie à partir de divers substrats détaillés ci-après ainsi que des formes mobiles de N via la production de Glu et d'urée en plus de jouer un rôle dans la régulation des processus cellulaires, notamment via la formation de ROS. Ce n'est que récemment que le rôle des mitochondries pendant la sénescence a été approfondi par les travaux de Chrobok *et al.* (2016) chez *A. thaliana* (figure 23). Ils ont confirmé que malgré une diminution d'environ 30 % des mitochondries pendant la sénescence, leur intégrité structurale et fonctionnelle est conservée jusqu'à la fin de la sénescence, mais associée à des modifications majeures du transcriptome (49 % des gènes mitochondriaux) et des reconfigurations des voies métaboliques. Les gènes associés aux deux principales voies de production d'énergie des mitochondries, le cycle de Krebs et la Chaîne de Transfert des Électrons (CTE), sont stables tout au long de la sénescence, avec quelques modifications dans la nature des isoformes composant la CTE, confirmant le maintien des activités de base des mitochondries. Les auteurs ont également observé une augmentation des transcrits associés aux voies cataboliques de plusieurs acides aminés. C'est le cas des gènes

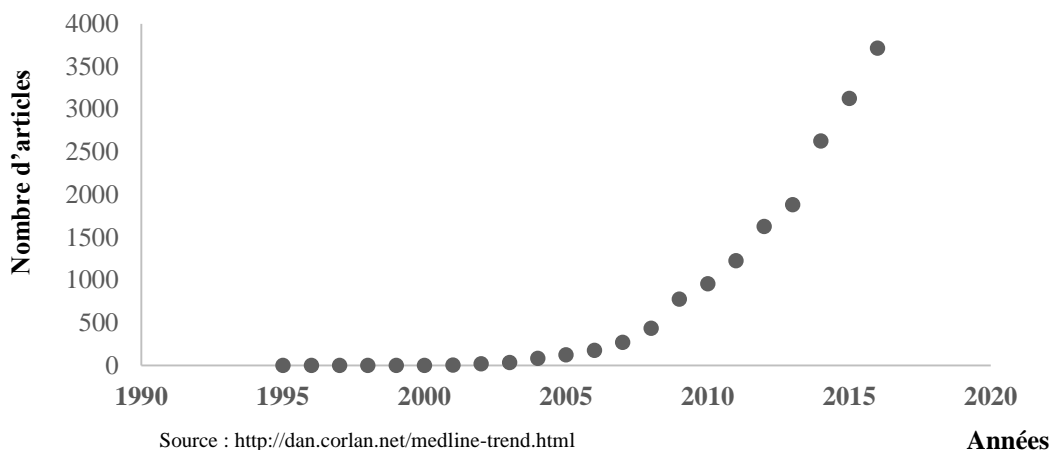


Figure 24 : Evolution du nombre d'articles traitant de métabolomique dans la base de données de Medline entre 1990 et 2018.

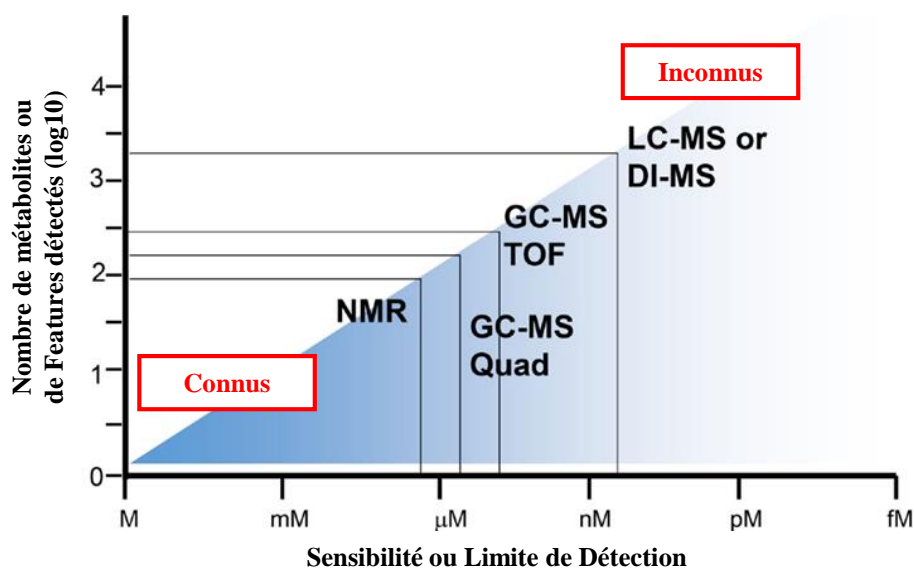


Figure 25 : Gammes de sensibilité et performances (nombre d'analytes et capacités d'identification structurale) des technologies d'analyses du métabolome. La RMN (NMR) permet d'étudier précisément quelques composés connus et la spectrométrie de masse (MS) permet d'accéder à un plus grands nombre d'analytes dont une partie n'est pas identifiée (inconnus) (d'après Stringer *et al.*, 2016 adapté d'après Wishart, 2011).

impliqués dans la dégradation de la Pro : la Proline Déshydrogénase (ProDH) et la Pyrroline-5-Carboxylate Déshydrogénase (P5CDH) qui serait également alimentée par l'Arg via sa conversion en Orn par une Arginase puis en Pyrroline-5-Carboxylate (P5C) par l'Ornithine-delta-Aminotransférase (OAT) dont l'expression est également augmentée. Cette voie produit également de l'urée qui peut être transportée à longue distance (Bohner *et al.*, 2015). L'oxydation mitochondriale de la Pro fournirait directement des électrons à la CTE alimentant ainsi la production d'ATP. L'oxydation complète de la Pro pourrait fournir jusqu'à 30 eq. ATP (Atkinson, 1977). Les acides aminés branchés (Ile, Leu et Val) peuvent également servir de source d'énergie alternative via l'isovaleryl-CoA dehydrogenase (IVDH) en alimentant directement la CTE (Peng, 2015; Hildebrandt *et al.*, 2015). La Lys peut être dégradée par plusieurs voies dont la topologie et la contribution pendant la sénescence ne sont pas élucidées : via la D-2-Hydroxyglutarate Déshydrogénase (2-HGDH) ou la Lysine Ketoglutarate Réductase (LKR) et la Saccharopine Déshydrogénase (SaccDH) qui conduisent à la formation d'Acetyl-CoA, de pouvoir réducteur et de Glu. Pendant la sénescence, la dégradation de la Gly passe de la décarboxylation, via la Glycine Décarboxylase (GDC) et la Serine Hydroxymethyl Transférase (SHMT) à la transamination, via l'AlaT et la Glyoxylate Aminotransférase (GlxT). Cette transition permet de passer de la production de Ser à la production de Glu et de Glyoxylate. Ce dernier peut alors rejoindre le cycle du Glyoxylate dans le peroxyosome pour produire des acides organiques et alimenter le cycle de Krebs (Hildebrandt *et al.*, 2015).

Il existe donc de très nombreux réarrangements métaboliques dans les mitochondries qui leur permettent d'optimiser la production d'énergie et de métabolites exportables à partir des produits de dégradation des lipides et des protéines. Il y a néanmoins quelques acides aminés qui s'accumulent dans les tissus sénescents (notamment les acides aminés ramifiés) ce qui suggère des limitations dans la redistribution, le transport ou la régulation de ces voies de dégradation par ailleurs très variables suivant les espèces considérées (Watanabe *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2017b; Clément *et al.*, 2018).

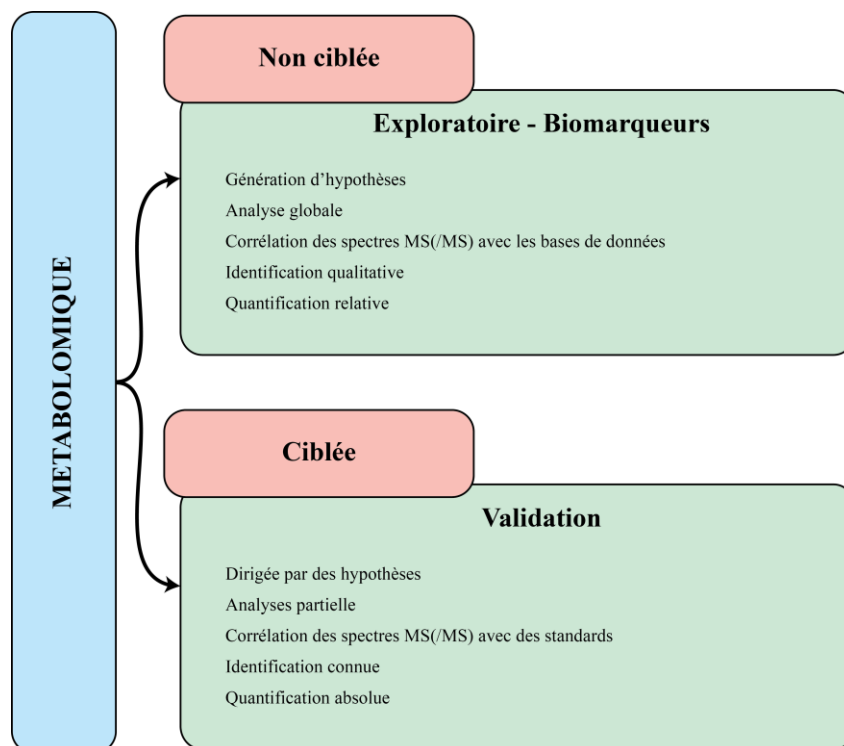


Figure 26 : Comparaison des approches métabolomiques non ciblées et ciblées en termes de démarches et de finalités (adaptée d'après Schrimpe-Rutledge *et al.*, 2016).

4. L'approche métabolomique en soutien à des questionnements physiologiques

4.1. Historique et définition de la métabolomique

La métabolomique consiste à quantifier et qualifier de manière systématique l'ensemble des petites molécules (< 1 500 kDa) issues du métabolisme, appelées « métabolites », dans une unité biologique définie et à un instant donné. Si le concept d'identification de métabolites dans un système biologique (il est souvent fait référence dans ce cadre aux substances naturelles) trouve ses origines entre 1 500 et 2 000 av. J-C. avec la mise en relation entre le sucre et le diabète par Susruta et Charaka (d'après Frank, 1957), ce n'est qu'au XVIII^e siècle que les premières méthodes de chimie analytique et d'analyses quantitatives des métabolites voient le jour. Au XX^e siècle, le développement des méthodes de séparation chromatographique a permis l'amélioration de la résolution des composés chimiques représentés dans un mélange complexe et l'identification ainsi que le dosage simultanés de quelques métabolites. Cela a débuté avec l'avènement de la chromatographie par adsorption développée par Tsvet en 1906 (d'après Berezkin, 1989), puis le développement de la chromatographie de partage en phase gazeuse (GC) notamment (Martin, 1948), puis en phase liquide éluée à haute pression (HPLC) (Giddings, 1964). En parallèle, dans le domaine de la physique, de nouvelles technologies d'analyses spectrométriques et spectroscopiques des éléments voient le jour avec le développement du premier spectromètre de masse (MS) par Thomson et Aston en 1922 (d'après Frank, 1957; Griffiths, 2008) et le développement de la résonance magnétique nucléaire (RMN) simultanément par Purcell et Bloch (Bloch *et al.*, 1946; Purcell *et al.*, 1946). Ces deux techniques initialement développées pour l'étude de matières solides et homogènes ont été adaptées à la chimie analytique, puis à la biologie dans les années 60-70s. La RMN est largement utilisée pour identifier la structure des molécules et la MS pour réaliser des profilages métaboliques, notamment via le couplage avec les méthodes séparatives (GC-MS, LC-MS). Ces couplages ont rendu possibles la détection, l'identification et la quantification simultanées de plusieurs dizaines à une centaines de métabolites. Ces quinze dernières années, l'utilisation et le développement de ces technologies a connu un essor très important en biologie (figure 24) (Kell, 2004). Les performances chromatographiques ont été améliorées et optimisées avec la chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC), les seuils de sensibilité ont été abaissés, la résolution des appareils a été largement accrue (figure 25) et de nouvelles

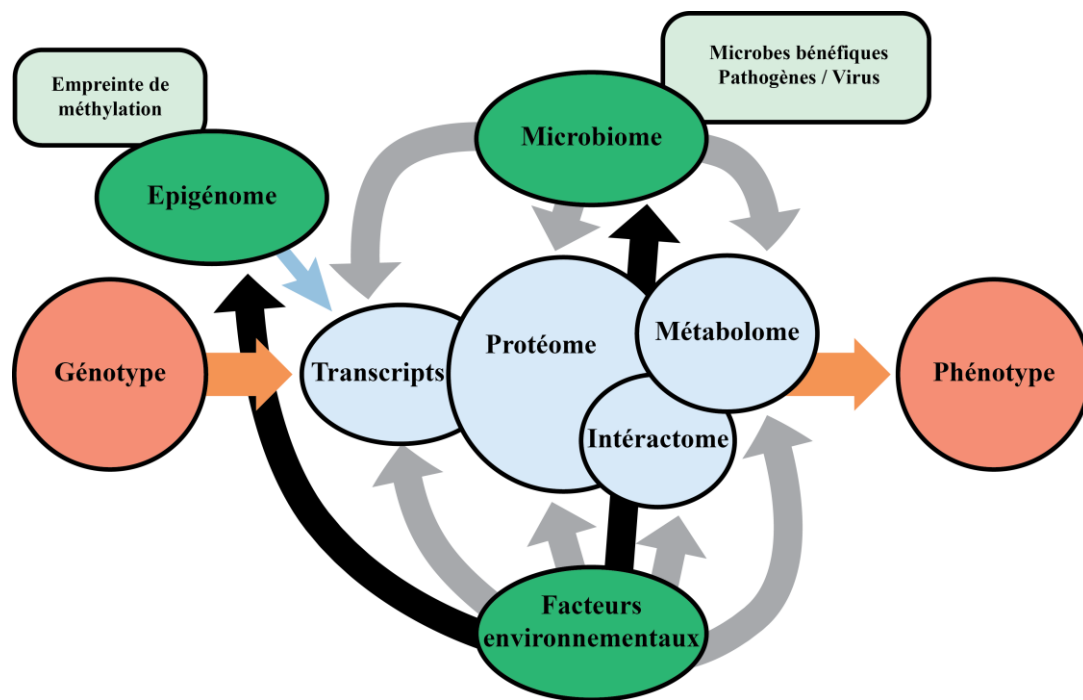


Figure 27 : Principaux déterminants biologiques et environnementaux de l'expression du phénotype. Pour un génotypes donné, les facteurs modulant le phénotype observé sont nombreux. Le protéome, l'épigénome, le transcriptome et le métabolome sont influencés par les facteurs environnementaux et par le microbiote (d'après Boggess *et al.*, 2013).

procédures sont apparues en MS faisant notamment appel, à la fragmentation moléculaire (MSn) et plus récemment à la mobilité ionique (IMS) (Gabelica et Marklund, 2018), permettant aujourd'hui d'établir des profils métaboliques de plusieurs centaines à quelques milliers de molécules simultanément. Si l'objectif de la métabolomique est de couvrir l'ensemble du métabolome, les technologies actuelles ne permettent pas d'y parvenir (Viant *et al.*, 2017). En effet, la diversité physico-chimique et les gammes de concentrations des espèces chimiques présentes dans les tissus biologiques sont trop larges et dépassent les propriétés extractives des solvants et les gammes dynamiques et résolutive des appareillages. Par exemple dans le règne végétal, la diversité moléculaire est estimée à plus de 200 000 molécules (Hartmann, 2007). Obtenir une couverture métabolique la plus large possible nécessite bien souvent de réaliser, en parallèle, plusieurs procédures de prélèvement, d'extraction et d'analyse, sans atteindre pour le moment une image qui se veut exhaustive du contenu en métabolites d'un échantillon. De ce fait, les approches métabolomiques sont souvent conduites selon deux orientations (figure 26), d'une part les démarches dites « ciblées » qui vont viser à caractériser et quantifier le plus justement possible des molécules dont l'identité ou l'appartenance biochimique sont prédéterminées et connues, et d'autre part les approches dites « non-ciblées » ou sans *a priori* qui visent à établir le profil, le plus large possible, des métabolites détectables dans un échantillon, mais qui se heurtent bien souvent à de grosses difficultés d'identification structurale.

4.2. L'intérêt et les ambitions des approches métabolomiques

Le phénotype d'un organisme résulte des interactions combinatoires entre plusieurs éléments structurants organisés par le génome (ADN, ARN, protéines et métabolites) avec l'environnement. Dans l'échelle d'organisation moléculaire du vivant, le métabolome traduit cette combinatoire complexe, au plus proche du phénotype moléculaire, dans la mesure où il reflète l'ensemble des régulations opérées en amont sur le transcriptome, l'épigénome, le protéome, l'interactome eu égard le contexte génomique et les pressions environnementales, biotiques et/ou abiotiques qui s'exercent (figure 27) (Johnson *et al.*, 2003; Cornish-Bowden and Cárdenas 2012). De ce fait, la métabolomique est complémentaire des autres approches « -omiques » et permet de faire un lien plus ténu avec le phénotype observable. En fonction des objectifs et des technologies déployées, cinq approches sont couramment employées (Dunn et Ellis, 2005) : l'analyse « ciblée »,

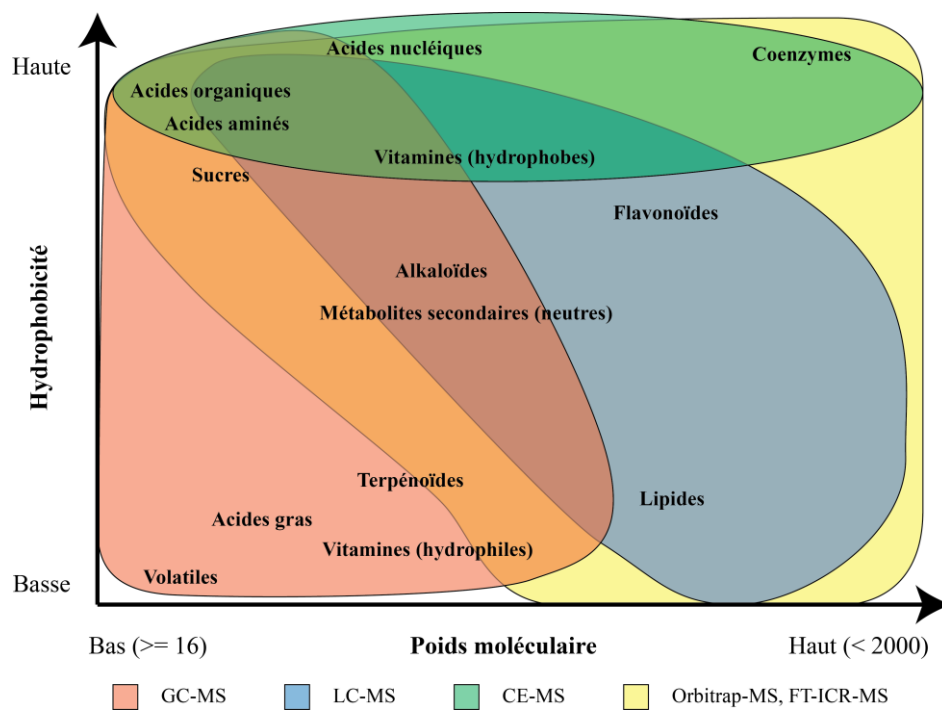


Figure 28 : Couverture conceptuelle de la capacité de détection des métabolites par les principales technologies de spectrométrie de masse (MS) (adaptée d'après Kusano *et al.*, 2011).

l’empreinte métabolique, le profilage métabolique, l’analyse métabolomique et la métabonomique. L’analyse ciblée vise à quantifier un ou plusieurs métabolites qui sont liés à une voie métabolique, un ensemble biochimique cohérent ou un système de régulation particulier. Les efforts de préparation, de purification éventuelle des échantillons et d’analyses sont alors dirigés vers la quantification et l’identification précises des composés ciblés. Pour ces raisons, c’est souvent la fragmentation par spectrométrie de masse qui est employée pour sa sélectivité et sa sensibilité. Par exemple, les analyses de phytohormones, qui sont présentes à l’état de traces dans les organismes, utilisent cette stratégie (Pan *et al.*, 2008). L’empreinte métabolique est utilisée pour classer des échantillons les uns par rapport aux autres en privilégiant la rapidité et le faible coût de l’acquisition. La préparation des échantillons est simplifiée au maximum et les métabolites ne sont ni quantifiés, ni identifiés avec précision. La détection est souvent réalisée par spectroscopie : ultra-violet (UV), infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) ou proche infrarouge (NIRS) ou RMN. Dans un deuxième temps, les différenciations biochimiques discriminantes peuvent faire l’objet d’approches analytiques plus poussées afin d’établir l’identité des biomarqueurs (Johnson *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2004; Font *et al.*, 2006). Le profilage métabolique fait bien souvent référence à la possibilité d’analyser simultanément, et avec un bon niveau de précision, des composés de mêmes propriétés physico-chimiques et apparentés sur le plan métabolique. Il intègre, par exemple, les études ciblant des familles moléculaires comme les acides aminés et amines (Soga et Heiger, 2000; Bouchereau *et al.*, 2000), les glucosinolates (Hogge *et al.*, 1988), les lipides (Cajka et Fiehn, 2014), etc. Le terme métabonomique est souvent employé comme un synonyme de métabolomique, mais l’approche est souvent circonscrite au domaine médical et cible plus particulièrement les études qui sont associées à des traitements pharmaceutiques ou bien à une pathologie (Dunn et Ellis, 2005). L’approche métabolomique est considérée comme holistique, sans *a priori* et non ciblée, utilisée pour quantifier et identifier le plus grand nombre de représentants métaboliques dans un échantillon biologique ou un prélèvement environnemental. Les efforts analytiques sont alors concentrés vers des techniques de séparation très résolutes, de détection universelle et sensible et de systèmes bioinformatisés adaptés au traitement de gros volumes de données (De Vos *et al.*, 2007; Allwood et Goodacre, 2010). Si l’identification des composés d’intérêt est un objectif majeur de cette approche, elle n’est souvent que partielle (figure 28) et demande des étapes de validation et de confirmation structurales qui obligent à revenir à des approches ciblées. Cette stratégie « omique » est en plein essor et de nombreuses études visent à fluidifier les procédures d’analyses et de traitement des

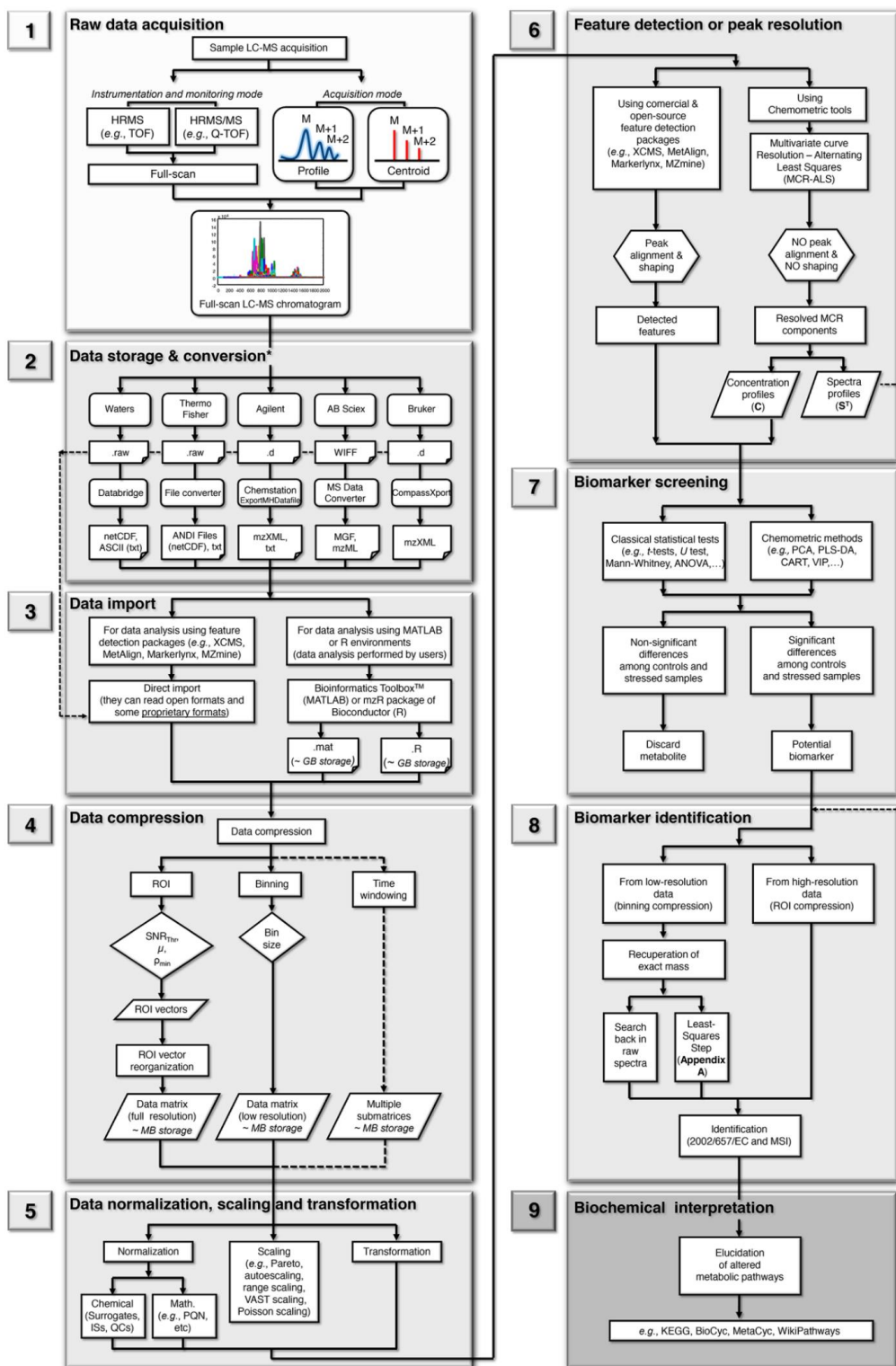


Figure 29 : Workflow des 9 étapes associées aux analyses non-ciblées en métabolomique. Elles sont organisées en trois groupes : L'acquisition des données (1), le traitement des données et la détection des composés (2-8) et l'interprétation biologique (9). Les parallélogrammes représentent des matrices/vecteurs de données, les rectangles représentent les étapes de calculs, les notes représentent des exemples de formats et logiciels propriétaires. A noter que seule la méthode MCR-ALS est présentée pour la résolution des pics, mais il existe d'autres méthodes (PARAFAC, ICA) (adaptée d'après Gorrochategui *et al.*, 2016).

données (Sugimoto *et al.*, 2012; Misra, 2018; Barupal *et al.*, 2018). Elle est largement utilisée dans le domaine végétal pour étoffer les connaissances et pour la recherche de biomarqueurs associés au développement, à la qualité des produits ou bien encore à la réactivité de la plante à son environnement biotique ou abiotique. Dès lors que ces approches de métabolomique amènent à comparer différents génotypes (de diversité naturelle ou modifiée), elles deviennent des outils puissants de chémotypage ou de métabotypage qui associés à des démarches de génotypage et à des tailles de populations adaptées peuvent être utilisées comme outils de génomique fonctionnelle (qualifier la fonction d'un gène) ou de recherches de mQTL par génétique de liaison ou par mGWAS.

4.3. Workflow en métabolomique non ciblée par spectrométrie de masse

Le couplage de la spectrométrie de masse à une méthode de séparation chromatographique est particulièrement adapté à l'approche non ciblée. La séparation chromatographique (LC ou GC) permet de séparer les molécules dans le temps (temps de rétention), ce qui permet de limiter le nombre de molécules entrant dans la source du spectromètre de masse à un temps donné. Cette limitation permet de diminuer le phénomène d'extinction ionique (lorsque des molécules entrent en conflit et réduisent le rendement d'ionisation de la source) et d'augmenter la sensibilité et la fiabilité des mesures. Le workflow classique d'une étude métabolomique se découpe en six étapes : la préparation des échantillons, l'acquisition des données, le prétraitement des données, l'analyse des données, l'identification des métabolites ou des réseaux métaboliques d'intérêt et leur interprétation biologique (Wang *et al.*, 2015). La préparation des échantillons va déterminer la nature des métabolites qui vont être analysés par la suite (polaire, apolaire, etc). Elle comprend les méthodes de prélèvement, de fixation des tissus et d'extraction qui doivent être adaptées aux objets biologiques prélevés et aux molécules ciblées. De même, la pertinence du plan d'expérimentation, de prélèvement et d'échantillonnage, le nombre de répétitions, la mise en oeuvre des contrôles qualité et l'exploitation de standards internes pour normaliser et corriger les biais d'extraction et d'analyse vont largement déterminer la qualité finale des analyses (Duportet *et al.*, 2012; Dunn *et al.*, 2012; Dudzik *et al.*, 2018). L'acquisition des données (figure 29) est réalisée par la mise en oeuvre d'une plateforme analytique adaptée aux objectifs, à la nature des composés extraits (polaires, apolaires, volatiles) et à celle des échantillons (matrice simple ou complexe). Cette plateforme associe généralement une méthode de séparation

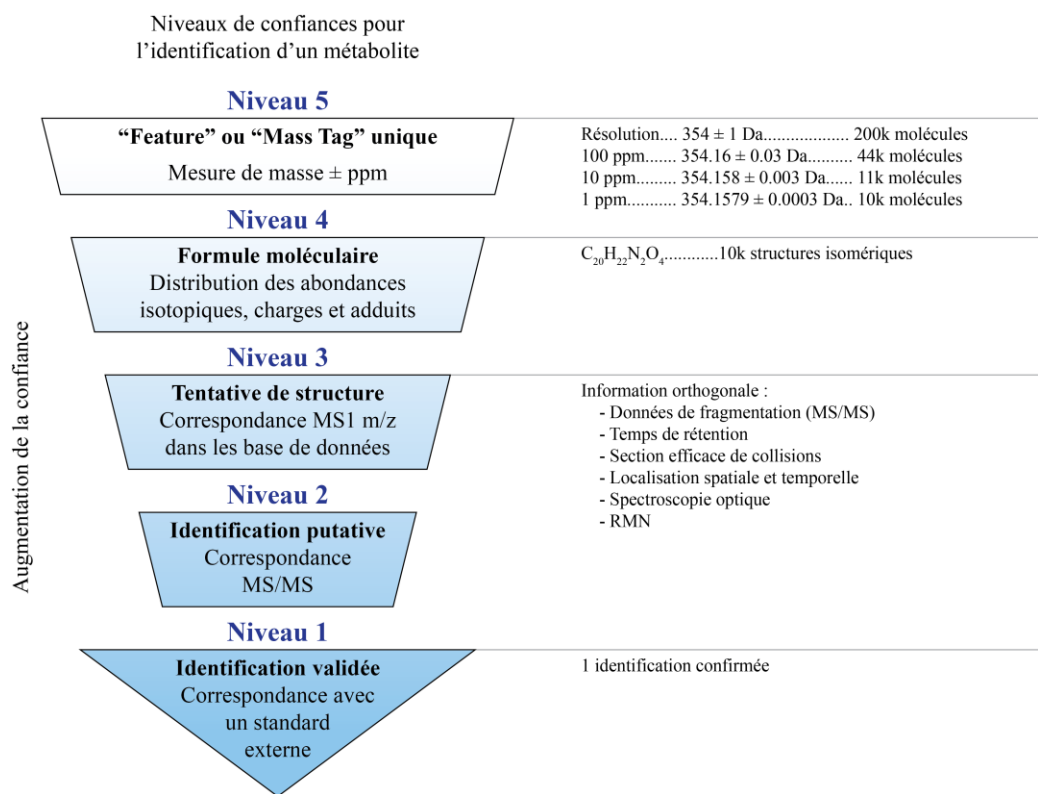


Figure 30 : Les 5 niveaux d'identification d'un analyte (adaptée d'après Schrimpe-Rutledge *et al.*, 2016).

chromatographique (GC, HPLC, UHPLC, Électrophorèse Capillaire : CE) avec une méthode d'ionisation en mode positif et/ou négatif (impact électronique : EI ; electrospray : ESI ; ionisation chimique : CI ; désorption et ionisation laser assistée par une matrice : MALDI ; ionisation ambiante : APCI) (Awad *et al.*, 2015) et un détecteur de masse (plus exactement du rapport m/z) à haute résolution (HRMS) couplé ou non à la MS_n et dans certains cas à l'IMS. Les données générées sont à trois dimensions dans le cas le plus simple : des intensités associées à un rapport m/z pour un ion donné et un temps de rétention. Dans le cas de combinaisons plus complexes (MS_n et IMS) l'énergie de fragmentation, le rapport m/z de l'ion parent et des ions fils ainsi que du temps de dérive peuvent venir compléter ces dimensions. Dans certains cas, les systèmes chromatographiques placés en amont peuvent être mis en oeuvre dans plusieurs dimensions (en GC notamment). Le prétraitement des données (figure 29-2 à 6) permet d'isoler les intensités pour chaque ion détecté et de corriger les biais analytiques (la dérive des temps de rétention, l'atténuation du signal due à l'encrassement de la source d'ionisation, la présence de signaux artéfactuels et parasites). Cette partie se décompose en cinq étapes (Gorrochategui *et al.*, 2016) : la conversion, l'importation et la compression des données (figure 29-4), la normalisation des signaux (figure 29-5) et la détection des pics chromatographiques correspondant aux ions (figure 29-6). Les algorithmes et les outils choisis pour mener les étapes de normalisation et de détection des pics chromatographiques conditionnent directement la qualité des résultats finaux (Rafiei et Sleno, 2015; Di Guida *et al.*, 2016; Spicer *et al.*, 2017). L'analyse des données (figure 29-7) correspond à la mise en oeuvre d'outils statistiques et de visualisations qui permettent de sélectionner les ions d'intérêts, c'est-à-dire des biomarqueurs potentiels. Généralement, elle consiste à gérer une combinaison entre les analyses multivariées et les tests de probabilité. Les analyses non discriminantes relèvent le plus souvent de l'analyse en composante principale (PCA) alors que les analyses discriminantes ont plutôt recours à la régression des moindres carrés partiels (PLSDA) et sa variante orthogonale (OPLSDA). En parallèle, les méthodes de classification sont souvent utilisées pour regrouper les individus et les ions similaires. Les méthodes classiques de statistique probabiliste (le test de Wilcoxon, le test T de Student et l'ANOVA) sont utilisées pour conforter les résultats mis en avant par les approches multivariées. Plus récemment, les méthodes associées à l'apprentissage automatique (machine learning) comme le séparateur à vaste marge (SVM) et les forêts d'arbres décisionnelles (random forest) commencent à être appliquées à la métabolomique (Gromski *et al.*, 2015) de même que les approches bayésiennes (Bartel *et al.*, 2013). Bien que ces méthodes soient prometteuses, elles sont encore peu employées

| Bilan sur la reproductibilité et la lisibilité des étapes d'analyses de données en m | | | | Oui | Non | % d'études remplissant les conditions |
|---|--|--|--|-----|-----|---------------------------------------|
| Reproductibilité complète, code + données, liens et exe | | | | 0 | 27 | 0.00 |
| Reproductibilité partielle : code ou code + données sans liens ni exe | | | | 1 | 26 | 0.27 |
| Workflow d'analyses fournis sans code ni données | | | | 0 | 27 | 0.00 |
| Descriptions claires permettant de reproduire le workflow | | | | 1 | 26 | 0.27 |
| Au moins un workflow sur une partie des analyses | | | | 7 | 21 | 1.89 |
| Code disponibles sur demande | | | | 1 | 6 | 0.27 |
| Données disponibles sur demande | | | | 2 | 25 | 0.54 |
| Code utilisant des outils open source | | | | | | |
| R | | | | 2 | | 0.54 |
| Matlab | | | | 5 | | 1.35 |

| Etapes de pré-traitement | | Oui | Non | |
|---|--|-----|-----|------|
| Workflow disponible | | 0 | 27 | 0.00 |
| Proportion des valeurs manquantes renseignés | | 2 | 25 | 0.54 |
| Normalisation, centrage, mise à l'échelle ou transformation | | 24 | 3 | 6.48 |
| Renseignement sur les contrôles qualités utilisés | | 12 | 15 | 3.24 |
| Description des étapes permettant de reproduire le workflow | | 1 | 26 | 0.27 |

| Etapes d'analyses supervisées | | Oui | Non | |
|---|-----------------------------------|-----|-----|------|
| Algorithmes utilisés | (O)PLSDA | 24 | | 6.48 |
| | RF | 2 | | 0.54 |
| | SVM | 1 | | 0.27 |
| | PLS-SVM | 1 | | 0.27 |
| | >1 | 1 | | 0.27 |
| Informations suffisantes pour reproduire les analyses | | 1 | 26 | 0.27 |
| Mesures des performances du modèle | Performance de la prédiction | 1 | | 0.27 |
| | VIP | 4 | | 1.08 |
| | R2X/R2Y/Q2/R2 | 14 | | 3.78 |
| | Sensibilité/Spécificité/Précision | 9 | | 2.43 |
| | Matrix de confusion | 1 | | 0.27 |
| Validation externe | Validation indépendante | 12 | | 3.24 |
| | Sur données externes | 3 | | 0.81 |
| | Sur un sous set des données | 9 | | 2.43 |
| Performance de la validation externe | Sensibilité/Spécificité/Précision | 5 | | 1.35 |
| Informations sur l'analyse ROC | | 12 | 15 | 3.24 |

| | | |
|---------------------------|----|--------|
| Nombre d'études utilisées | 27 | 100.00 |
|---------------------------|----|--------|

Figure 31 : Information et critères de répétabilité comparés des différentes étapes d'analyses des données à partir de 27 articles publiés en métabolomique. Aucun article ne permet une reproduction complète des analyses réalisées et très peu renseignent les paramètres permettant de reproduire les analyses (modifiée d'après Considine *et al.*, 2017).

en métabolomique. L'identification des molécules (figure 29-8) s'effectue sur la base de la masse précise de l'ion moléculaire, des fragments associés et de leur temps de rétention (Dunn *et al.*, 2013). L'identification d'une molécule est associée à un indice de certitude, initialement proposé par Sumner *et al.* (2007) puis affinée avec l'évolution des méthodes d'identification (figure 30) (Schrimpe-Rutledge *et al.*, 2016). L'échelle d'identification comporte 5 niveaux, du moins au plus strict : le niveau 5 correspond à un composé inconnu dont seul la masse exacte est connue, le niveau 4 est atteint lorsque la formule chimique est connue (par mesure des abondances isotopiques précises), le niveau 3 nécessite d'avoir des informations orthogonales identiques (temps de rétention, section efficace de collision, localisation spatiale, spectroscopie optique, RMN), le niveau 2 permet d'obtenir une identification putative et nécessite d'obtenir un spectre par fragmentation (MS_2) qui correspond à un composé connu et enfin le niveau 1 est le plus strict et nécessite de confirmer la structure de la molécule par rapport à un standard externe de référence (identification exacte). L'approche non ciblée étant sans *a priori*, les métabolites présents sont rarement tous connus et ne permettent pas d'être comparés exhaustivement avec des standards. La méthode d'identification utilisée consiste à rechercher la masse exacte de l'ion dans les bases de données en ligne ou locales (Vinaixa *et al.*, 2016; Misra, 2018). Cette méthode permet rarement d'attribuer un nom unique à une molécule et dépend de la qualité des bases de données et des informations disponibles chez l'organisme étudié. Néanmoins, des méthodes sont en cours de développement pour utiliser les informations de fragmentation (MS_n) afin d'identifier avec plus de précision les ions sur la base de leur structure (Vaniya et Fiehn, 2015; Allard *et al.*, 2017). Ces méthodes basées sur les réseaux moléculaires permettent notamment d'attribuer des composés inconnus à des familles de molécules et parfois d'identifier de nouvelles molécules. La dernière étape d'interprétation (figure 29-9) vise à utiliser des méthodes statistiques et de visualisation pour tenter d'expliquer, biologiquement, les variations des molécules identifiées. L'une des premières étapes consiste à associer les molécules aux voies métaboliques connues en utilisant soit : les bases de données en ligne (comme KEGG et BioCyc), des outils d'aide à l'interprétation qui intègrent l'ensemble des voies métaboliques d'un organisme (Cottret *et al.*, 2010), des outils d'enrichissement qui associent chaque composé à une voie métabolique (Barupal et Fiehn, 2017) ou encore des méthodes basées sur les réseaux de corrélations qui permettent de regrouper les métabolites en fonction de leurs variations (Steuer, 2006; Grapov *et al.*, 2015). Le workflow associé aux analyses métabolomiques non ciblées par spectrométrie de masse est particulièrement complexe et en constante

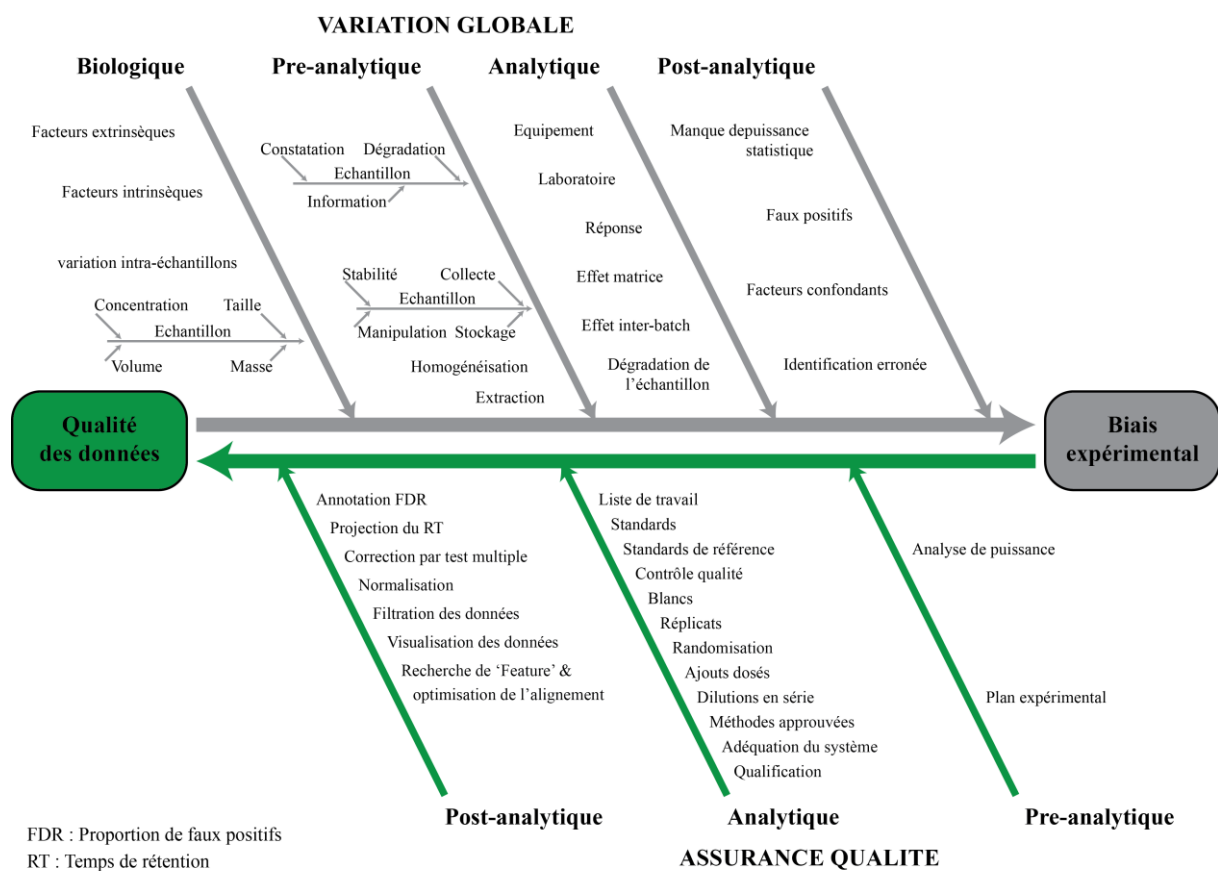


Figure 32 : Sources de variations expérimentales (en haut) et procédures de contrôles qualités (en bas) qui permettent de minimiser les biais en analyse métabolomique (d'après Dudzik *et al.*, 2018).

évolution. Chaque étape peut devenir une source de biais qui influencera l'interprétation biologique (Dudzik *et al.*, 2018).

4.4. Limites et trajectoire de la métabolomique

L'information acquise est bien souvent dépendante et parfois connotée par le choix des procédures et des techniques mises en oeuvre : depuis le plan d'échantillonnage en passant par les méthodes d'extraction, de séparation, de détection, jusqu'au traitement bioinformatique des données brutes et les stratégies d'analyses statistiques choisies (figure 31) (Rafiei and Sleno 2015; Dudzik *et al.*, 2018). Les principales limites résident (1) dans la rigueur des conditions de production et de prélèvement des objets à analyser et des procédures d'échantillonnage (qualité, nombre, etc.), (2) dans la nécessité de retenir des conditions d'extraction qui par nature vont dicter la sélectivité des analytes, (3) dans la robustesse, le pouvoir résolutif, le débit, la répétabilité et la reproductibilité des procédures de chromatographies (4) dans le choix des plateformes et des configurations de spectromètres de masse qui déterminent les conditions d'ionisation, de fragmentation et le pouvoir résolutif, (5) dans la manipulation de solutions bio-informatiques de traitements des données brutes, (6) dans la capacité, souvent limitée à avoir accès à des bases de données de composés chimiques riches et fiables (notamment dans le domaine végétal) (7) dans le stockage de l'information et les capacités de retraitement et de partage. L'ensemble de ces limites impacte la reproductibilité et l'interconnexion des études métabolomiques. Il existe aujourd'hui de nombreux outils qui visent à normaliser le traitement des données métabolomiques pour en améliorer la reproductibilité et la comparaison (Workflow4Metabolomics, XCMS Online, MetaboAnalyst, COSMOS, etc.). Cependant la spécificité de chaque étude nécessite d'ajuster avec précision les différents paramètres du workflow pour en assurer la qualité. Par exemple, les travaux isolés de Baran (2017) montrent que sur cinq jeux de données analysés avec des outils en ligne semi-automatique, au moins 50 composés ont été omis par les paramètres d'intégration et plusieurs composés ont été incorrectement annotés. En outre, les informations contenues dans les articles ne sont souvent pas suffisantes pour reproduire avec exactitude les étapes de traitement, ce qui nuit à la reproductibilité des analyses (figure 32) (Considine *et al.*, 2017). D'un point de vue biologique, l'approche métabolomique permet d'obtenir le profil métabolique d'un échantillon à un instant donné. C'est un profil figé qui dépend du statut métabolique de l'organisme dans des conditions bien précises. Or les réactions métaboliques sont très dynamiques et évoluent constamment en réponse aux régulations

internes et externes. La fluxomique, qui est un domaine connexe à la métabolomique, permet, souvent par enrichissement isotopique, de suivre et quantifier l'incorporation d'un composé dans les voies métaboliques (Ratcliffe et Shachar-Hill, 2006; Kruger et Ratcliffe, 2009). La spectrométrie de masse permet de distinguer les isotopologues et ainsi de connaître le nombre d'atomes provenant de la molécule infiltrée dans les métabolites. La RMN permet d'obtenir des informations sur les isotopomères et ainsi de connaître la position des atomes incorporés au sein des molécules. La fluxomique est une approche extrêmement prometteuse, notamment lorsqu'elle est associée à la modélisation des voies métaboliques d'un organisme (Dieuaide-Noubhani *et al.*, 2007; Salon *et al.*, 2017). D'un autre côté, ces deux approches, métabolomique et fluxomique, ciblent des tissus spécifiques ou des organes dans leur globalité, mais la localisation des métabolites dans les tissus ou à l'échelle sub-cellulaire n'est pas directement accessible. L'imagerie par spectrométrie de masse est une approche récente qui permet, grâce au MALDI-TOF ou au FT-ICR de créer des cartes métaboliques de coupes tissulaires (Boughton *et al.*, 2016; Sturtevant *et al.*, 2016). Par ailleurs, des techniques de fractionnement sub-cellulaire peuvent être utilisées, en amont, pour tenter d'approcher la définition du métabolome à cette échelle. Ces approches, très délicates, dans la mesure où l'intervention technique sur les tissus ne doit pas perturber la distribution intracellulaire des métabolites, par nature très labiles, peuvent être basées sur des technologies de fractionnement en système non aqueux (Klie *et al.*, 2011).

5. L'intérêt des approches multi-omiques

Le profilage métabolomique ne permet pas à lui seul de comprendre des systèmes biologiques complexes intégrant de nombreux niveaux de régulations révélés notamment au niveau du transcriptome, du protéome ou de l'épigénome (Wanichthanarak *et al.*, 2015). En effet, comme déjà évoqué, l'image métabolomique est le résultat des différents niveaux de régulation à un instant donné. La combinaison d'approches « omiques » est donc souvent nécessaire pour mieux comprendre le fonctionnement des organismes et des processus complexes dans leur ensemble (Kim *et al.*, 2016; Großkinsky *et al.*, 2018). Le transcriptome permet d'obtenir des informations sur la régulation de l'expression des gènes, qui, comme nous l'avons souligné dans le cadre du développement et de la sénescence foliaire, peut s'avérer très complexe (Penfold et Buchanan-Wollaston, 2014). En couplant ces informations avec les profils métaboliques, il est possible de consolider les niveaux de régulation des caractères métaboliques révélés (post-translotionnels, (post-

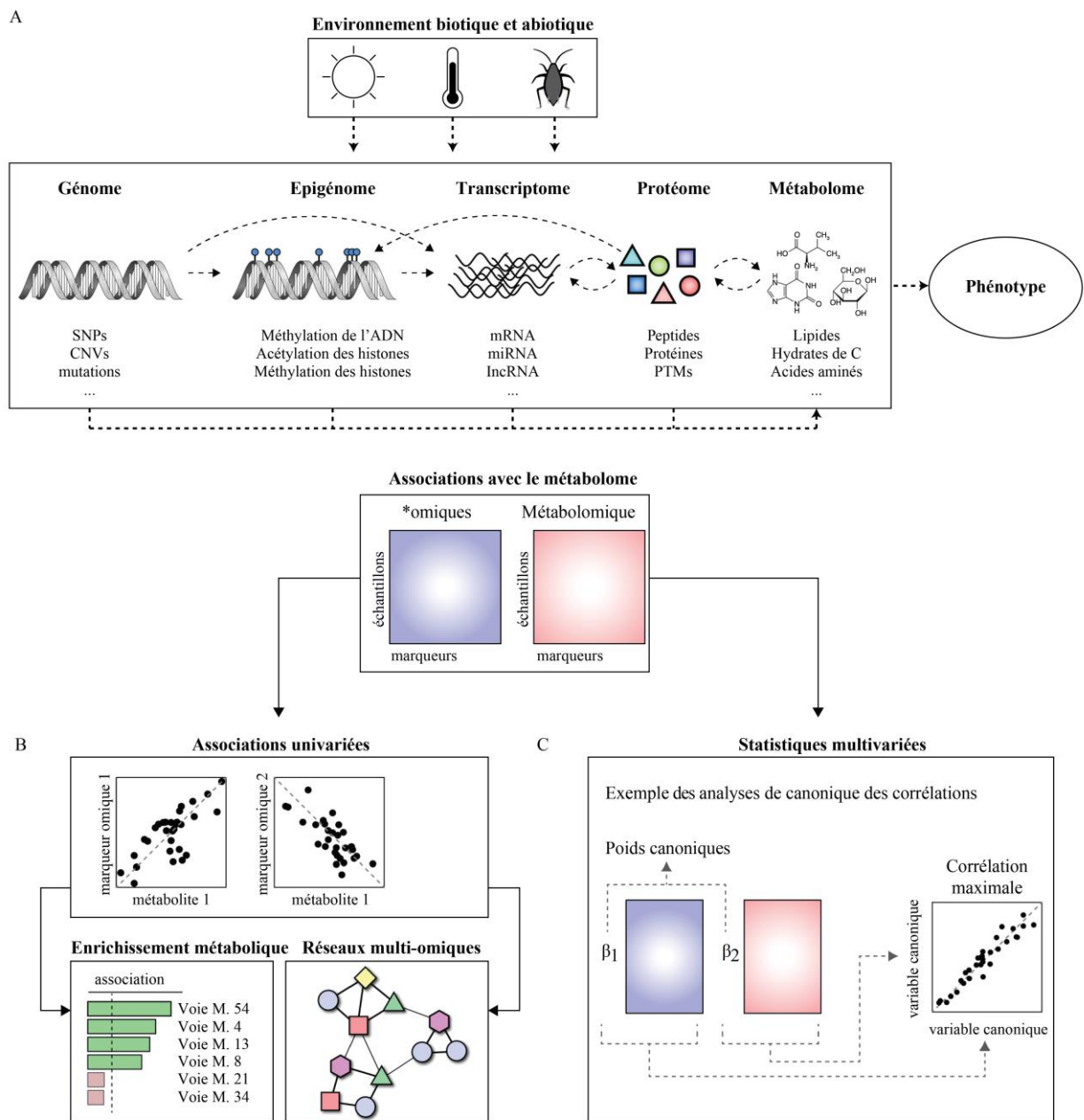


Figure 33 : Concepts simplifiés de la définition analytique de la biologie des systèmes. Les différents niveaux d'interactions entre l'environnement, les niveaux omiques et le phénotype sont aujourd'hui accessibles par plusieurs méthodes (A). Le métabolome est particulièrement intéressant puisqu'il intègre à la fois les facteurs environnementaux et moléculaires qui conduisent au phénotype. L'analyse combinée du métabolome avec les autres approches omiques peut être réalisée par des analyses univariées (B) qui permettent d'identifier des voies métaboliques sur-représentées et des réseaux de corrélations entre les variations métaboliques et les autres marqueurs omiques. Les analyses multivariées (C) utilisent la covariance, généralement élevée, entre les marqueurs multi-omiques pour les regrouper (comme par exemple avec l'analyse canonic des corrélations) (adaptée d'après Krumsiek *et al.*, 2016).

)traductionnels ou épigénétiques) sans nécessairement pouvoir les différencier. Les études combinant les approches transcriptomiques et métabolomiques sont encore assez rares chez les plantes (Hirai *et al.*, 2004; Sana *et al.*, 2010; Moschen *et al.*, 2016) et sont souvent associées à du profilage ciblé plutôt qu'à une approche non ciblée (Kogel *et al.*, 2010; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2014; Balazadeh *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2017b). Cela s'explique par la difficulté de corrélérer les jeux de données produits par les deux approches et surtout de les interpréter. En effet, l'interprétation est très dépendante des informations disponibles chez l'organisme considéré (génomique, annotations, voies métaboliques, identité des composés). Plusieurs approches sont possibles pour interpréter ce type de données, des approches intégrant l'ensemble des marqueurs omics comme les analyses multivariées canoniques ou bien en se limitant aux marqueurs connus par enrichissement des voies métaboliques et de régulation et par la construction de réseaux de corrélations (figure 33) (Wanichthanarak *et al.*, 2015; Krumsiek *et al.*, 2016). Si les approches non ciblées sont plus complexes à interpréter, elles couvrent une plus grande partie du métabolome et permettent d'une part, d'alimenter les bases de données pour permettre un traitement globalisé de l'information acquise et d'autre part, de révéler des relations par ailleurs inaccessibles grâce à l'expression du transcriptome.

PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

Dans la perspective d'optimiser, génétiquement, l'efficacité de remobilisation des nutriments et plus particulièrement du N chez le colza, l'objectif principal de ces travaux de thèse a consisté à **caractériser l'architecture métabolique, spatiale et temporelle, du développement foliaire et notamment de la phase de sénescence, fenêtre principale de la mise en oeuvre des processus de recyclage et de redistribution des nutriments. Il s'est agi également d'évaluer l'impact de l'environnement de la plante, nutritionnel notamment, sur la configuration de ces empreintes et de ces signatures métaboliques.** L'enjeu a consisté à révéler des éléments régulateurs ou effecteurs du métabolisme, sollicités dans le cadre des relations établies entre les organes sources et les organes puits, et susceptibles (1) d'alimenter nos champs de connaissances en matière de physiologie métabolique du développement et de la sénescence foliaire et (2) de fournir des éléments tangibles d'intervention sur la plan génétique pour améliorer les performances et l'efficacité nutritionnelle de la plante.

La présentation des travaux dans ce manuscrit a été découpée en trois chapitres construits sur la base d'articles scientifiques et complétés par des éléments de contexte bibliographique et scientifique replaçant les questionnements abordés par rapport aux connaissances actuelles :

❖ Chapitre 1

Réorganisation spatiale et temporelle du métabolisme au cours du développement foliaire du colza d'hiver.

Le premier chapitre fait état de la définition du métabolisme foliaire au cours du développement, de manière à délimiter les ajustements opérés, dans le temps et dans l'espace, en lien avec les relations trophiques de type sources puits établies à l'échelle de la plante et les processus de remobilisation de nutriments exacerbés au cours de la sénescence. Afin de s'affranchir de perturbations environnementales et qualifier les évolutions métaboliques liées aussi strictement que possible au développement intrinsèque des tissus foliaires, les expérimentations ont été conduites dans un environnement stable et contrôlé avec une alimentation non limitante en eau et en nutriments. L'apparition des feuilles sur le colza est séquentielle, chaque feuille a un âge et un statut trophique qui lui est propre et dépend à la fois du développement local de la

feuille ainsi que du développement globale de la canopée. Cela permet de décrire temporellement et spatialement le développement foliaire selon deux axes : l'axe vertical, correspondant à l'axe de la plante où chaque rang foliaire, à un moment donné, traduit un stade de développement (dans un microenvironnement spécifique) et l'axe horizontal où chaque étage est suivi au cours du temps. Qui plus est, à l'échelle du limbe, l'asynchronie développementale a été évaluée sur la plan métabolique depuis la base jusqu'à l'apex (ce que l'on a défini comme étant l'axe longitudinal) tout comme la variabilité des profils métaboliques établis entre les tissus du mésophylle, ceux de la nervure centrale et la composition du phloème (ce que l'on a défini comme étant l'axe transversal). Des marqueurs physiologique et moléculaires ont été mis en oeuvre pour accompagner et baliser la définition des différents stades développementaux. Le profilage métabolomique a été réalisé en utilisant parallèlement deux stratégies : une approche ciblant des composés régulateurs et des composés effecteurs associés au recyclage de nutriments et une démarche non ciblée par spectrométrie de masse à haute résolution des fractions polaires. Toute la partie ciblée a été mise en oeuvre au sein du Plateau de Profilage Métabolique et de Métabolomique (P2M2) de l'Unité et le profilage non ciblé a été réalisé en partenariat avec le Pr. Bruno Le Bizec et le Dr. Yann Guitton au sein du laboratoire d'étude des résidus et contaminants dans les aliments (LABERCA) à Nantes. Ces deux dispositifs analytiques fonctionnent conjointement au sein de la plateforme distribuée de Métabolomique « Corsaire » du GIS Biogenouest.

Les principaux acquis sont formalisés sous la forme d'un article soumis actuellement à *Plant Physiology* :

Dechaumet S., Guitton Y., Leconte P., Rolland S., Leprince F., Marnet N., Berardocco S., Jonard C., Le Bizec B., Le Caherec F., Nesi N., Bouchereau A. (submitted) Metabolome reconfiguration of leaf development, sink/source transition and senescence in *Brassica napus* L.

❖ Chapitre 2

Orientation métabolique de la proline pendant la sénescence foliaire au cours du développement végétatif du colza d'hiver.

Le deuxième chapitre concentre des informations plus spécifiques acquises autour du métabolisme de la proline, apprécié de manière originale, comme acteur potentiel des ajustements métaboliques/cataboliques mis en oeuvre au cours de la sénescence foliaire. Cet acide aminé, particulièrement connu pour être accumulé en conditions de stress hydrique, notamment chez le colza, est révélé ici comme contributeur potentiel à la

fourniture de glutamate et de glutamine remobilisables et comme substrat énergétique pour alimenter le fonctionnement mitochondrial lors de la sénescence. La problématique a été abordée en combinant trois approches : (1) une approche moléculaire pour mesurer l'expression des gènes impliqués dans les voies cataboliques de la proline au cours du développement foliaire, (2) une approche utilisant un traceur isotopique à partir de tissus foliaires isolés pour suivre l'incorporation du squelette carboné de la proline dans le métabolisme azoté et le métabolisme énergétique au cours du vieillissement et (3) une approche d'incorporation du traceur isotopique à l'échelle de la plante entière afin de vérifier la mobilité de la proline elle-même et sa capacité à vectoriser, à longue distance du carbone, de l'azote et de l'énergie.

Les principaux résultats sont représentés sous la forme d'un article à soumettre dans la revue *Journal of Experimental Botany* :

Dechaumet S., Pellizzaro A., Bizouerne E., Marnet N., Jonard C., Berardocco S., Denis A-M., Clouet V., Niogret M-F., Bouchereau A. (en préparation) Senescence-induced proline catabolism as a source of substrates and energy for nutrient recycling processes in oilseed rape leaves.

❖ **Chapitre 3**

Variations génotypiques du métabolome et du transcriptome au cours des processus foliaires de remobilisation trophique pendant la phase reproductrice du colza dans différents contextes de fertilisation azotée.

Le troisième chapitre a vocation à fournir des éléments d'appréciation des noeuds de régulations transcriptomique et métabolomique associés au processus de remobilisation des ressources foliaires pendant la sénescence dite monocarpique (pendant la phase reproductrice) chez le colza, produit en serre, dans différentes situations de fertilisation azotée. Ces travaux s'appuient par ailleurs sur l'étude comparative de deux génotypes de colza décrits comme différenciés sur le plan de leur efficacité de remobilisation de l'azote foliaire, notamment en conditions de fertilisation déficitaire. Comme dans le premier chapitre, nous avons la volonté de suivre les évolutions métabolomiques (ciblée et non ciblée) et transcriptomiques (microarray) au cours du temps du développement du limbe foliaire. Ces travaux ont fait l'objet d'un partenariat très étroit avec l'équipe de Philippe Etienne et Jean-Christophe Avice de l'UMR 950 (INRA, Université de Caen Basse Normandie) à Caen pour la production, le traitement, le suivi, la récolte et l'analyse du matériel biologique (Girondé *et al.*, 2015), avec le Pr. Bruno Le Bizec et le Dr. Yann Guitton au sein du laboratoire d'étude des résidus et contaminants dans les aliments

(LABERCA) à Nantes pour l'approche métabolomique non ciblée et avec Biogemma pour l'approche transcriptomique par puce à ADN.

Les principaux résultats sont formalisés sous la forme d'un article scientifique qu'il est prévu de soumettre dans le cadre d'une édition spéciale de la revue *Metabolomics* :

Dechaumet S., Orsel M., Le Caherec F., Niogret M-F., Clouet V., Marnet N., Jonard C., Berardocco S., Escourrou A., Guitton Y., Girondé A., Trouverie J, Etienne P., Avice J-C., Nesi N., Bouchereau A. (en préparation). Metabolomic and transcriptomic regulation of nitrogen remobilization efficiency in two oilseed rape genotypes.

MATERIEL ET METHODES

MATÉRIEL & MÉTHODES

Chacune des parties construites sur le format d'un article scientifique fera référence aux matériels et aux méthodologies qui leur sont propres. Les propos qui suivent font référence aux matériels et aux méthodes plus génériques et précisent certaines procédures souvent déclinées dans les articles de manière synthétique.

1. Matériel végétal et conditions de culture

1.1. Matériel végétal

Les objectifs des deux premiers chapitres sont ciblés sur la caractérisation métabolique de la sénescence séquentielle (végétative) dite naturelle volontairement obtenue dans des conditions de production semi-contrôlées à contrôlées. Tous les travaux ont été conduits à partir du même génotype, à savoir la variété « Aviso » qui est encore aujourd'hui utilisée en production et qui présente une grande stabilité de rendement. Elle est notamment utilisée comme témoin par le Comité Technique Permanent de la Sélection (CTPS) et par le Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains (Terres Inovia). Dans l'unité, ce génotype est régulièrement intégré dans les panels testés au champ et constitue par ailleurs l'un des parents d'une population en ségrégation d'haploïdes doublés disponible. Dans le cadre du troisième et dernier chapitre, il s'agit de révéler simultanément les propriétés métaboliques et transcriptomiques de tissus foliaires en développement lors de la phase reproductrice et des événements de sénescence monocarpique dans un dispositif expérimental conduit en conditions contrôlées qui comparait plusieurs génotypes selon différents niveaux de fertilisation azotée (Girondé *et al.*, 2015). Deux génotypes ont été extraits de ce dispositif à savoir les variétés Aviso et Oase décrites pour des propriétés différenciées en termes d'efficacité de remobilisation de l'azote (Girondé *et al.*, 2015)

1.2. Culture en serre à lumière naturelle

1.2.1. Production au stade végétatif

Les semis (variété Aviso) ont été réalisés en mini-mottes, puis après 14 jours les plantules les plus vigoureuses ont été repiquées dans des pots de 2 L transférés en serre avec un cycle photopériodique, pour la période considérée, d'environ 16/8 h (jour/nuit ; J/N). Un

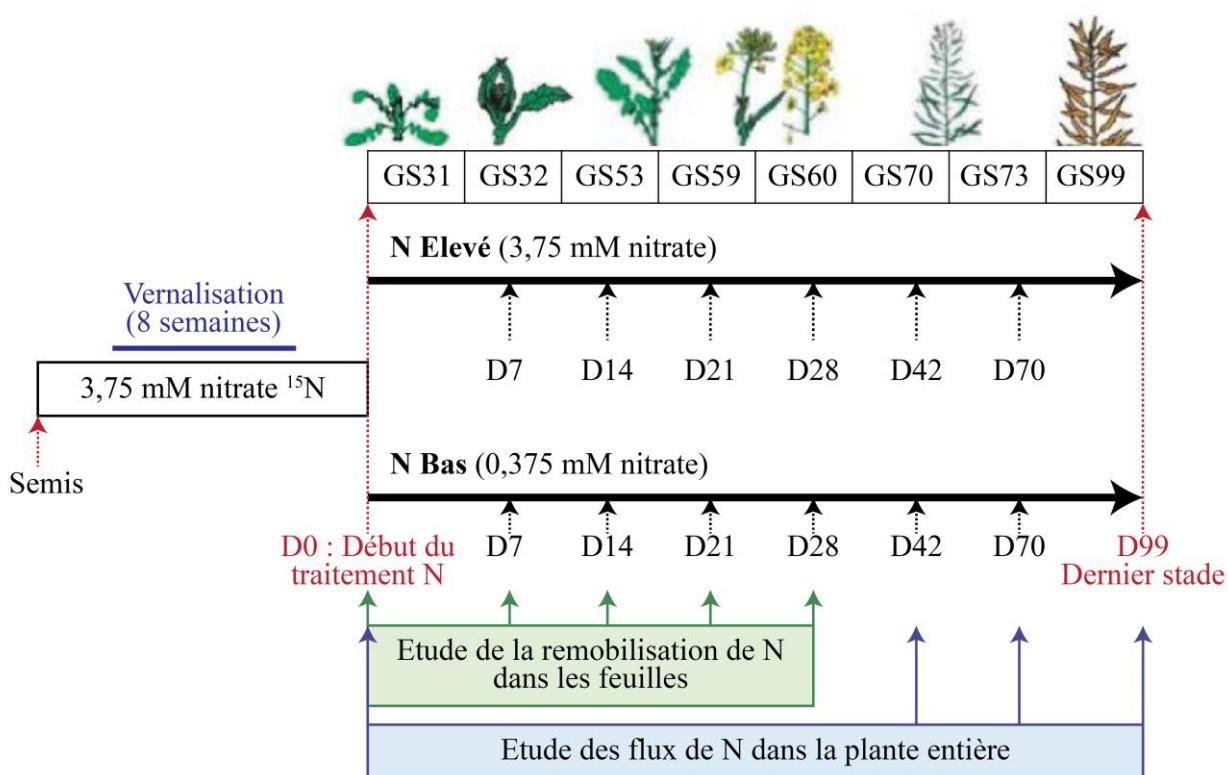


Figure 34 : Schéma illustrant le plan expérimental utilisé pour cultiver deux variétés de colza (Aviso et Oase) en serre à lumière naturelle (d'après Girondé *et al.*, 2015).

dispositif de lampes d'appoint a été utilisé afin de maintenir un rayonnement minimal de $200 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pendant la phase lumineuse. Dans ces conditions, l'arrosage a été réalisé 2 à 3 fois par semaine en fonction des besoins des plantes avec une solution nutritive complète (Liquoplant Bleu de Plantin, France). Les récoltes ont été réalisées à différents stades de développement identifiés par la suite.

1.2.2. Production jusqu'au stade reproducteur avec ajustement de l'alimentation azotée

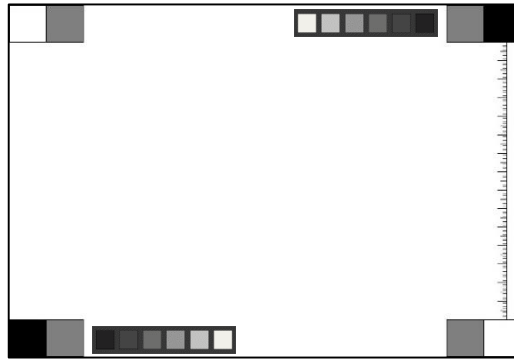
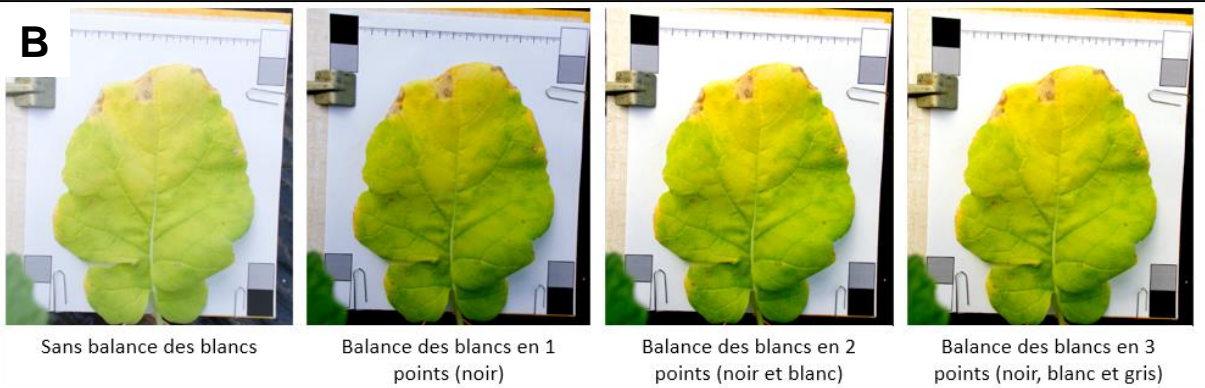
Les graines (variétés Aviso et Oase) ont été stérilisées puis semées dans de la vermiculite hydratée (figure 34). A l'apparition de la première feuille, les jeunes plantes ont été alimentées pendant deux mois avec une solution de Hoagland (Hoagland et Arnon, 1938) à 25 % ($1,25 \text{ mM Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $1,25 \text{ mM KNO}_3$; $0,5 \text{ mM MgSO}_4$; $0,25 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$; $0,2 \text{ mM EDTA-2NaFe-3H}_2\text{O}$; $14 \mu\text{M H}_3\text{BO}_3$; $5 \mu\text{M MnSO}_4$; $3 \mu\text{M ZnSO}_4$; $0,7 \mu\text{M (NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$; $0,7 \mu\text{M CuSO}_4$; $0,1 \mu\text{M CoCl}_2$). Pendant cette période de deux mois, les plantes ont été vernalisées en chambre climatique selon une photopériode de 10/14 h (J/N) et une thermopériode de 10/4 °C (J/N). Puis les plantes ont été transférées individuellement dans des pots de 2 L (perlite:vermiculite ; 2:1) et placées en serre à lumière naturelle de manière à obtenir une densité de 40 plantes par m^2 avec une thermopériode de 20/15 °C (J/N). Le traitement nutritif différencié a été appliqué à partir du stade GS31 (J0) jusqu'à la fin de la culture (figure 34). La moitié du dispositif a été alimenté à l'aide de la solution de Hoagland ajustée à 3,75 mM en nitrate (High Nitrate ; HN) et l'autre moitié à l'aide de la solution ajustée à 0,375 mM de nitrate (Low Nitrate ; LN). Pour les deux génotypes et les deux traitements, les prélèvements ont été réalisés à 4 stades correspondant à : GS32 atteint 7 jours après l'application du traitement différenciant (J7), GS53 après 14 jours (J14), GS59 après 21 jours (J21) et GS60 après 28 jours (J28). A J0 toutes les feuilles ont été étiquetées individuellement afin de suivre leur développement. Parmi ces feuilles, une feuille considérée comme mature à J0 et encore présente à J28 a été sélectionnée pour les analyses transcriptomique et métabolomique de manière à considérer les événements moléculaires associés au vieillissement et à la sénescence. Les échantillons prélevés ont été immédiatement congelés dans l'azote liquide puis divisés en deux fractions stockées à -80 °C. Une fraction a été utilisée pour extraire les ARNs qui ont servi à l'analyse transcriptomique, l'autre fraction a été lyophilisée puis utilisée pour extraire les composés solubles qui ont été analysés par spectrométrie de masse à haute résolution.

1.3. Culture en chambre climatique

Les chambres climatiques permettent de limiter les variations liées à l'environnement (éclairage, température, hygrométrie, mouvement d'air, etc...). Ces conditions ont été optimisées pour produire le matériel végétal valorisé dans le cadre du chapitre 1. Les semis ont été réalisés en mini-mottes, puis après 14 jours, les plantules les plus vigoureuses ont été repiquées individuellement dans des pots de 2 L et transférées en chambre climatique selon une photopériode de 16 h / 8 h (J/N) sous un éclairage de 300 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ pendant l'héméropériode, avec une humidité relative de 65/80 % (J/N) et une température 18/20 °C (J/N). L'arrosage a été réalisé 3 fois par semaine avec une solution nutritive complète (Liquoplant Bleu de Plantin, France).

1.4. Prélèvements du phloème

Les prélèvements du contenu phloémien sont réalisés en utilisant la méthode d'exsudation facilitée par l'EDTA. Le principe consiste à faire diffuser le contenu phloémien par échange osmotique dans une solution d'eau après section du pétiole et en présence d'acide ethylène-diamine-tétra-acétique (EDTA) pour inhiber les processus de réparation (Tetyuk *et al.*, 2013). Les feuilles à prélever sont coupées avec une lame de scalpel à la base du pétiole et la partie sectionnée est placée dans une solution d'EDTA (à 20 mM). Les pétioles sont à nouveau sectionnés dans la solution d'EDTA afin de supprimer les bulles d'air qui pourraient venir rompre la conductivité des tissus. Les feuilles sont placées dans des tubes à hémolyse contenant 5 mL de la solution d'EDTA de manière à ce que l'extrémité sectionnée soit immergée. L'ensemble est ensuite placé à l'obscurité dans une enceinte saturée en humidité pendant 1 h à température constante (20 °C). Les feuilles sont ensuite transférées dans de nouveaux tubes contenant 5 mL de la solution d'EDTA pendant 2 heures ou bien 1, 2, 4 et 6 heures suivant les expérimentations (à l'obscurité et à 20 °C). Les feuilles sont ensuite jetées et la solution d'exsudation est congelée dans l'azote liquide puis lyophilisée. Pour analyser le contenu en acides aminés ou glucides, l'extrait sec peut être repris dans 1 mL d'eau ultra pure par agitation puis transféré dans des fioles adaptées pour l'instrument d'analyse. Les résultats sont rapportés à la durée d'exsudation et exprimés en $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

A**B****C**

| File | Edit | Font | Results |
|-------|--------|---------|---------|
| Area1 | Mean1 | Min1 | Max1 |
| 1 | 223958 | 151.882 | 25 255 |
| 2 | 223958 | 165.121 | 52 255 |
| 3 | 223958 | 20.743 | 0 214 |

Figure 35 : Exemple d'un fond avec plusieurs mires colorimétriques et une échelle de mesure pour photographier les feuilles (A). Un exemple de 3 méthodes de correction de la balance des blanc sur la coloration d'une photographie de feuille (B). La procédure pour obtenir les valeurs RGBs d'une image sous Fiji est présentée (C) : après avoir charger la photo dans Fiji et sélectionner les zones à mesurer, il faut ouvrir le 'ROI Manager' et choisir l'option 'Multi Measure' (1 et 2). Une fois les options ajustées (3) et validées (4), les moyennes RGB sont affichées dans un tableau avec les valeurs minimales et maximales (5).

1.5. Infiltration de marqueurs isotopiques dans des disques foliaires

Afin de préciser les orientations métaboliques de l'oxydation de la proline au cours du vieillissement foliaire, l'infiltration de proline marquée au ^{13}C ou au ^{15}N a été réalisée à partir de disques foliaires isolés. Plusieurs stades de développement foliaire ont été analysés (tissus jeunes, matures et sénescents) et ce à deux moments au cours de la photopériode (en milieu de journée et en fin de nuit). La procédure d'infiltration utilisée est la suivante : pour chaque tissu foliaire, 6 disques de 1 cm de diamètre ont été découpés à l'emporte-pièces puis placés dans des puits de plaques de 24 puits en présence de 400 μl d'une solution de proline ^{13}C uniformément marquée (Proline $^{13}\text{C}_5$ 30 mM + MES 10 mM + Triton X-100 0,5 %) ou de proline ^{12}C (Proline 12C 30 mM + MES 10 mM + Triton X-100 0,5 %). Trois cycles de mise sous vide (1 min) ont été réalisés afin d'augmenter l'efficacité de l'infiltration. Les disques ont ensuite été incubés sous légère agitation pendant 4 h, à 22 °C et à l'obscurité ou à la lumière (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). A l'issue, les disques ont été rincés à trois reprises en remplaçant la solution d'infiltration par une solution de MES (10 mM) avant d'être pesés puis congelés par immersion dans l'azote liquide. Les disques ont ensuite été broyés pendant 20 s à 30 Hz à l'aide d'un broyeur à billes (TissueLyser II, Qiagen, Pays Bas) puis les poudres ont été stockées au congélateur à -80 °C avant extraction.

2. Mesures physiologiques

2.1. Mesures de la biomasse et de la surface foliaire

La masse des tissus récoltés a été systématiquement mesurée au moment du prélèvement (masse fraîche) et après fixation dans l'azote liquide puis lyophilisation (masse sèche). Ces deux mesures permettent d'obtenir la biomasse produite ainsi que la teneur en eau des tissus. La surface foliaire a été estimée par analyse d'image. Les tissus prélevés ont été photographiés (Pentax Kr, Pentax, Japon) sur un support adapté contenant une mire de correction des couleurs ainsi qu'une échelle graduée (figure 35A). Les images ont ensuite été exportées sur ordinateur pour être détournées à l'aide de GIMP 2.8.2 (GNU Image Manipulation Program), puis la surface foliaire a été calculée à partir de l'échelle graduée à l'aide de l'application Fiji (Schindelin *et al.*, 2012).

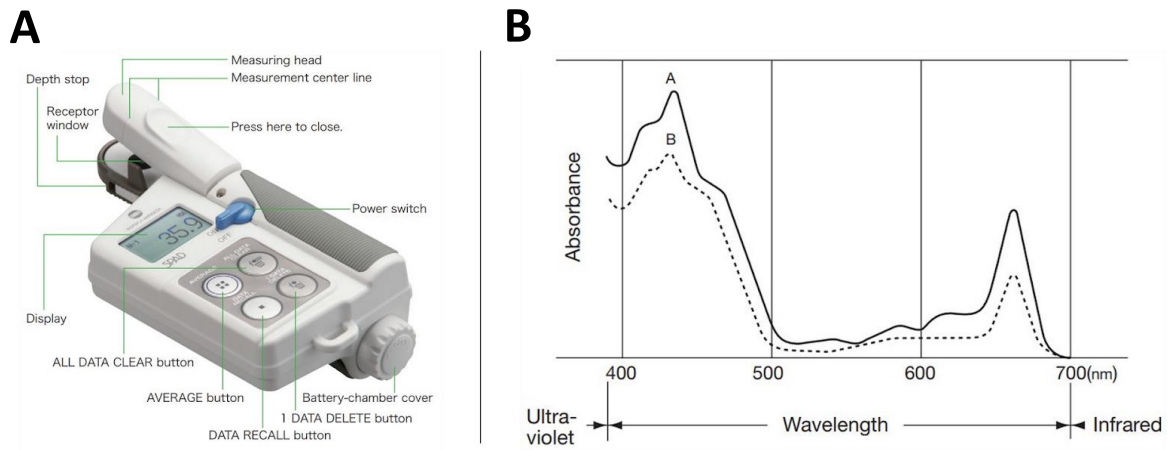


Figure 36 : Photographie descriptive de l'appareil SPAD modèle 502 (Minolta, Japon) (A) qui permet de mesurer le contenu relatif en chlorophylles d'une surface en utilisant les propriétés d'absorbance des chlorophylles (B) (d'après Minolta, 2017).

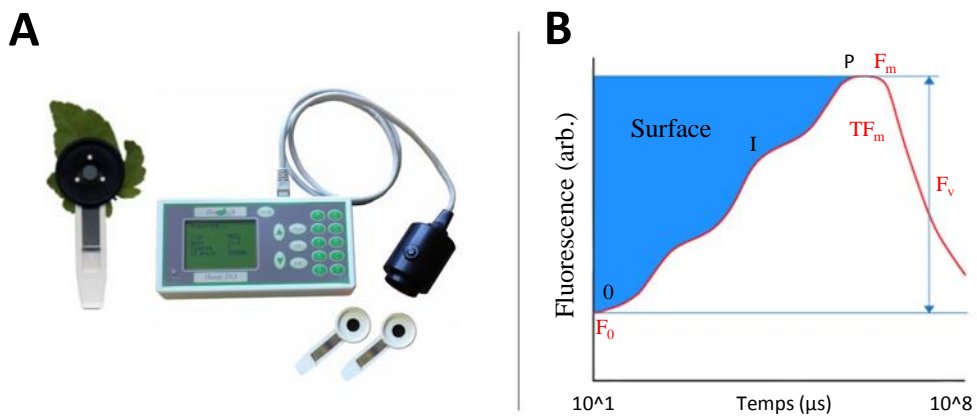


Figure 37 : Photographie d'un fluorimètre et de pinces pour adapter les tissus à l'obscurité (A) ainsi que du modèle cinétique d'évolution de la fluorescence d'un tissu chlorophyllien après excitation avec une source lumineuse saturante (B).

2.2. Mesures spectro-colorimétriques des feuilles

Les profils colorimétriques visibles des feuilles sont liés notamment à des modifications de leurs profils pigmentaires. Ces modifications sont particulièrement marquées pendant le vieillissement foliaire et peuvent être mesurées de plusieurs manières. La plus simple et la moins précise consiste à noter visuellement les colorations en s'appuyant sur une échelle prédéfinie de gamme de colorations. Une autre méthode consiste à utiliser des appareils spécifiques pour mesurer certains pigments (SPAD, colorimètres, etc.). Dans les présents travaux, les feuilles ont été photographiées pendant les prélèvements et une méthode a été mise en place afin de quantifier le profil Rouge/Vert/Bleu (RGB) à partir de clichés numérisés. Tout d'abord la feuille doit être photographiée dans des conditions lumineuses homogènes, perpendiculairement au limbe foliaire, en utilisant une mire colorimétrique et sans flash (figure 35A). Ensuite, la déviation colorimétrique est corrigée sous GIMP 2.8.2 en utilisant l'outil d'ajustement des niveaux en trois points (blanc, gris et noir) (figure 35B). Une fois l'image corrigée, les valeurs R, G et B sont mesurées sous Fiji comme indiqué dans la figure 35C.

2.3. Mesure de la teneur relative en chlorophylles

L'appareil portatif « Soil Plant Analysis Development » (SPAD modèle 502, Minolta, Japon) permet d'estimer le niveau relatif en chlorophylles des feuilles, sans invasion des tissus. Il s'agit d'une pince portative qui mesure le rapport de transmittance (ou d'absorbance) d'une surface dans le rouge et dans le rouge-lointain (figure 36A). Etant donné que l'absorbance dans le rouge est proportionnelle à la teneur en chlorophylles et que cette dernière n'absorbe pas la lumière dans le rouge lointain (figure 36B), la valeur obtenue est proportionnelle à la teneur en chlorophylles. Les valeurs sont exprimées en unité arbitraire (u.a.). Pour chacun des tissus étudiés, le contenu relatif en chlorophylles a été mesuré en 5 points du limbe foliaire.

2.4. Mesure du rendement quantique de la photochimie des photosystèmes II

Le rendement quantique (F_v/F_m) du photosystème II (PSII) est un paramètre représentatif des capacités photosynthétiques d'un tissu chlorophyllien. Il est mesuré à l'aide d'un fluorimètre (Chlorophyll II Fluorometer, Hansatech, Angleterre). L'appareil mesure l'évolution de la fluorescence d'une surface au cours du temps (figure 37A). Le principe

repose sur la mesure de la fluorescence émise par un tissu photosynthétique pré-adapté à l'obscurité lorsqu'il est exposé à un flash lumineux (figure 37B). En effet, après une période obscure suffisamment longue, les centres réactionnels des photosystèmes sont complètement oxydés (ouverts) et les chlorophylles sont au repos. A ce stade, la fluorescence émise est minimale (F_0). L'application d'un flash lumineux saturant va entraîner une excitation rapide des chlorophylles, observable par l'augmentation de la fluorescence, puis une réduction des PSII (fermeture) jusqu'à ce que la totalité des sites actifs soit fermée. La fluorescence est alors maximale (F_m). Ces deux paramètres permettent de calculer l'amplitude de variation de la fluorescence (F_v) comme étant la différence entre F_m et F_0 . Le ratio entre F_v et F_m est un indicateur du rendement maximal de fixation des électrons par les PSII.

2.5. Mesures des radiations photosynthétiquement actives

Seule une partie du rayonnement lumineux incident sur les feuilles est disponible pour produire de l'énergie. De plus, l'architecture du couvert compromet singulièrement l'homogénéité de l'intensité des radiations incidentes au niveau de chacun des étages foliaires mais également l'efficacité d'utilisation de ces radiations sur les plans énergétiques et développemental. La mesure des radiations photosynthétiquement actives (PAR) permet de connaître le potentiel énergétique d'un rayonnement lumineux percevable par une plante. Cette mesure est réalisée à l'aide d'un capteur quantique (LI-190R, Li-Cor, Etats-Unis) et donnée en $\mu\text{mol de photons}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. Dans le chapitre 1, les mesures de PAR ont été réalisées au niveau de chaque étage foliaire en plaçant la sonde perpendiculairement au centre de la feuille et en réalisant une moyenne à partir de 5 mesures.

3. Méthodes d'extraction des métabolites

3.1. Extraction combinée des composés polaires et apolaires

L'extraction solide:liquide:liquide a pour objectif de séparer les composés non solubles (débris cellulaires, parois, amidon et protéines) des composés hydro- et lipo-solubles, en fonction de leur affinité avec un solvant polaire (métabolites primaires et secondaires) et un solvant apolaire (lipides). La méthode la plus courante dite de « Blight & Dyer », ou

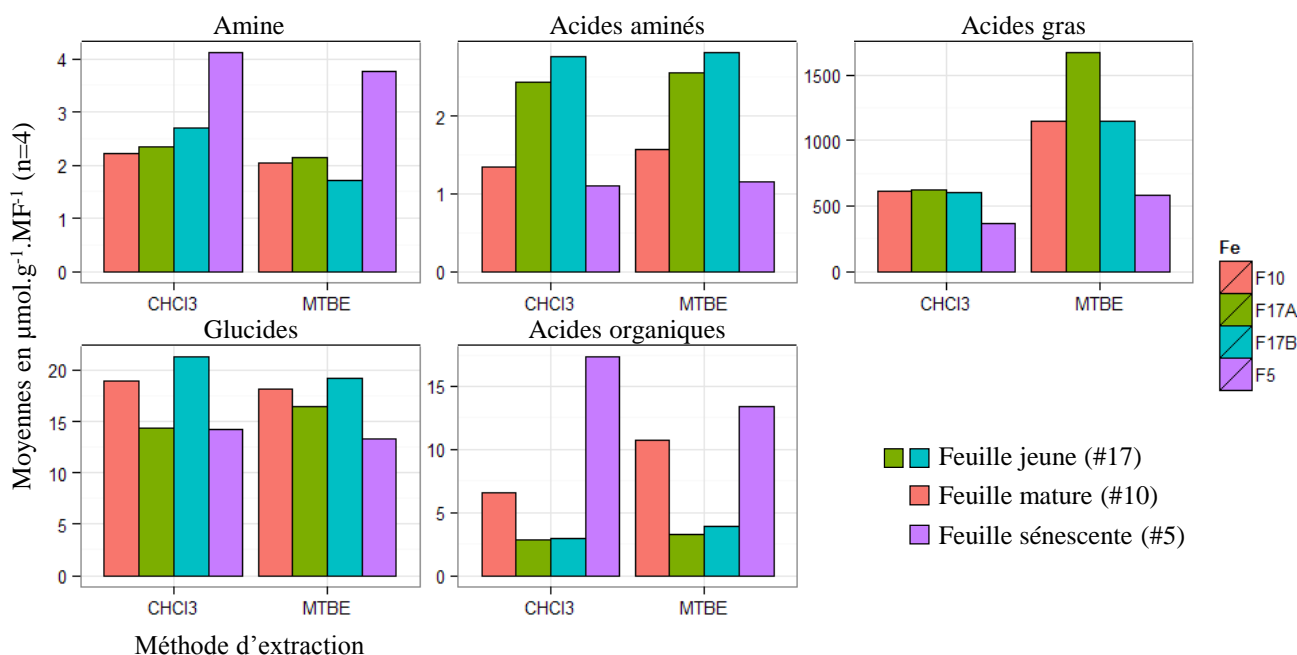


Figure 38 : Teneurs totales en acides aminés, amine, acides gras, glucides et acides organiques dans des échantillons de feuille jeunes, matures et sénescents après extraction soit avec du CHCl₃, soit avec du MTBE.

Tableau I : Caractéristiques des standards internes utilisés pour valider les méthodes d'extraction et d'analyses quantitatives (en GC-MS, LC-MS/MS et LC-HRMS).

| Standard | Famille | Formule | Clé InChI | Masse exacte |
|--|-------------|---|------------------------------|--------------|
| Adonitol | Glucide | C ₅ H ₁₂ O ₅ | HEBKCHPVOIAQTA-NGQZWQHPSA-N | 152.06847 |
| BABA | Acide aminé | CH ₃ CH(NH ₂)CH ₂ COOH | OQEBBZSWEGYTPG-UHFFFAOYSA-N | 103.06333 |
| Heptadecanoic acid | Lipide | CH ₃ (CH ₂) ₁₅ COOH | KEMQGTRYUADPNZ-UHFFFAOYSA-N | 270.25588 |
| Leucine-5,5,5,-d ₃ | Acide aminé | C ₆ H ₁₃ NO ₂ | ROHFNLQRQUHCH-LONBSJBQSA-N | 134.11346 |
| L-tryptophan-2,3,3-d ₃ | Acide aminé | C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂ | QIVBCDIJAJPQS-GAUJEYLJSA-N | 207.10871 |
| Indole-2,4,5,6,7-d ₅ -3-acetic acid | Auxine | C ₁₀ H ₉ NO ₂ | SEOVTRFCIGRIMH-SNOLXCFTSA-N | 180.09471 |
| 1,14-tetradecanedioic-d ₂₄ acid | Acide gras | C ₁₄ H ₂₆ O ₄ | HQHICYKULIHKCEB-JFPVQUMHSA-N | 282.33375 |

« Folch » (Folch *et al.*, 1957; Bligh et Dyer, 1959) fait référence au mélange Méthanol/Eau (MeOH:H₂O) pour la phase polaire et chloroforme (CHCl₃) pour la phase apolaire. Le principal inconvénient de cette méthode réside dans une mauvaise sédimentation des particules non solubles qui flocculent généralement à l'interface des deux solvants non miscibles compliquant ainsi leur récupération. Une variante consiste à remplacer le CHCl₃ par du methyl-tert-butyl-ether (MTBE) (Giavalisco *et al.*, 2011). Moins dense que l'eau, le MTBE va permettre à la phase apolaire de se positionner au-dessus de la phase polaire et les particules non-solubles vont ainsi précipiter au fond du tube après centrifugation. La récupération des différentes phases est alors facilitée et la répétabilité de la méthode s'en trouve normalement améliorée. Les deux méthodes ont ainsi été évaluées à partir d'échantillons témoins correspondant à des feuilles jeunes, matures et sénescents. Les profils des acides aminés libres, des glucides, des acides organiques et des lipides ont été réalisés (figure 38). En l'absence de différences notables, c'est la méthode basée sur le MTBE qui a été utilisée avec quelques modifications. L'extraction est généralement réalisée à partir de 10 mg de tissus lyophilisés puis broyés dès lors que le broyage n'avait pas eu lieu avant la lyophilisation. La première étape consiste à ajouter 1 mL du mélange d'extraction (MeOH:MTBE, 1:3, V:V) enrichi en composés de standardisation internes sélectionnés en fonction de la nature du dosage à réaliser (tableau I) : l'adonitol (ou ribitol) (90 µM) pour le dosage des glucides et acides organiques ; le BABA (45 µM) pour le dosage des acides aminés ; l'acide heptadecanoïque pour le dosage des lipides ; la leucine-5,5,5-d₃ (5 ng.ml⁻¹), le L-tryptophane-2,3,3-d₃ (50 ng.ml⁻¹), l'acide 2,4,5,6,7-d₅-3-acetic (5 ng.ml⁻¹) et l'acide 1,14-tetradecanedioic-d₂₄ (5 ng.ml⁻¹) pour le profilage non ciblé par spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS).

Ensuite, les préparations sont mises sous agitation pendant 30 min à 4 °C puis placées dans un bain à ultrasons pendant 10 min à 4 °C. La seconde étape consiste à ajouter 650 µl d'un mélange MeOH:H₂O (1:3, V:V) puis à agiter vigoureusement pendant 1 min et à centrifuger à 12 000 g pendant 5 min à 4 °C. La phase supérieure (phase organique) et la phase inférieure (phase polaire) sont récupérées séparément et une fraction aliquote de 50 µl est soumise à évaporation sous vide à l'aide d'un évaporateur centrifuge pendant 1 h 30 à 30 °C (Speed-Vac). Les fractions asséchées sont ensuite stockées à -80 °C avant analyse ultérieure.

3.2. Extraction des phytohormones

Les phytohormones sont des composés de natures physico-chimiques variables et présents à des faibles concentrations dans les tissus ($< 0,1 \mu\text{mol.mg}^{-1}$ de M.F.). De par cette faible abondance dans les tissus, les techniques de quantification doivent être à la fois robustes et sensibles. La spectrométrie de masse en tandem est donc particulièrement adaptée pour ces analyses, néanmoins la sensibilité de la technique est largement dépendante de la nature de la matrice liée l'échantillon. En effet, les interactions complexes établies entre les molécules présentes dans la source et dans l'analyseur peuvent modifier l'efficacité d'ionisation des molécules ciblées et de ce fait impacter négativement leur détection. Pour diminuer l'effet de la matrice, une étape d'extraction est réalisée suivi d'une séparation par chromatographie liquide à ultra-haute performance. Il existe plusieurs méthodes pour isoler les différentes classes de phytohormones (Pan *et al.*, 2010; Farrow et Emery, 2012; Almeida Trapp *et al.*, 2014). La méthode qui a été retenue consiste à réaliser deux extractions successives puis à concentrer l'extrait. Premièrement, 200 mg de tissus frais sont incorporés dans 1 ml du mélange d'extraction (MeOH:H₂O:HCOOH, 80:19:1, V:V:V). L'ensemble est homogénéisé puis traité aux ultrasons pendant 5 min à 4 °C. La préparation est ensuite centrifugée (10 min ; 12 000 g ; 4 °C) et le surnageant est récupéré. Les mêmes étapes sont réitérées à partir du culot solide. Enfin, les deux surnageants sont rassemblés et concentrés à sec à l'aide d'un évaporateur centrifuge. Le résidu sec est ensuite stocké à -80 °C avant utilisation.

4. Techniques de profilage métabolique ciblé

La diversité chimique des végétaux est très importante de par la nature structurale et les propriétés physico-chimiques de leurs métabolites constitutifs. Comme évoqué précédemment, l'accès exhaustif à la composition phytochimique des tissus est mission impossible. Les approches métabolomiques mises en oeuvre à ce jour, généralement associées à l'utilisation de plusieurs plateformes technologiques, qu'elles aient une vocation comparative, prédictive ou informative, font généralement appel à des démarches dites ciblées ou non ciblées suivant les choix réalisés a priori. Les deux démarches ont été entreprises au cours de ce travail afin de caractériser par des méthodologies ciblées des espèces ou des familles moléculaires considérées d'intérêt par rapport à la problématique, ces procédures spécifiques étant généralement déployées avec beaucoup de fiabilité pour qualifier et quantifier les analytes. Parallèlement, des approches non ciblées entreprises sans a priori quant aux analytes recherchés (sauf sans

Tableau II : Caractéristiques des standards externes utilisés pour quantifier les glucides et acides organiques par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID).

| Standard | Famille | Formule | Clé InChI | Masse exacte |
|--------------|--------------|-----------|-----------------------------|--------------|
| Adonitol | glucid | C5H12O5 | HEBKCHPVOIAQTA-ZXFHETKHSAN | 152.06847 |
| Arabinose | glucid | C5H10O5 | SRBFZHDQGSBBOR-HWQSCIPKSA-N | 103.06333 |
| Cellobiose | glucid | C12H22O11 | GUBGYTABKSRVRQ-CUHNMECISAN | 409.05012 |
| Citrate | organic acid | C6H8O7 | KRKNYBCHXYNGOX-UHFFFAOYSA-K | 270.05282 |
| Dulcitol | glucid | C6H14O6 | FBPFZTCFMRRESA-GUCUJZIJSAN | 270.25588 |
| Fructose | glucid | C6H12O6 | RFSUNEUAIZKAJO-VRPWFDPXSAN | 134.11346 |
| Fumarate | organic acid | C4H4O4 | VZCYOOQTPOCHFL-OWOJBTEDSAN | 207.10871 |
| Galactinol | glucid | C12H22O11 | VCWMRQDBPZKXKG-DXNLKLAMSAN | 180.09471 |
| Galactose | glucid | C6H12O6 | WQZGKKKJIFFOK-FPRJBGLDSAN | 282.33375 |
| Gentiobiose | glucid | C12H22O11 | DLRVVLDZNNYCBX-LIZSDCNHSAN | 342.11621 |
| Glucose | glucid | C6H12O6 | WQZGKKKJIFFOK-VFUOTHLCSAN | 180.06339 |
| Glycerate | organic acid | C3H7O7P | OSJPPGNTCRNQQC-UWTATZPHSA-K | 185.99294 |
| Glycolate | organic acid | C2H4O3 | AEMRFAOFKBGASW-UHFFFAOYSAN | 76.01604 |
| Glyoxylate | organic acid | C2H2O3 | HHLFWLYXYJOTON-UHFFFAOYSA-M | 74.00039 |
| Malate | organic acid | C4H6O5 | BJEPYKJPYRNKOW-REOHCLBHSAN | 134.02152 |
| Maltose | glucid | C12H22O11 | GUBGYTABKSRVRQ-PICCSMPSSAN | 342.11621 |
| Mannitol | glucid | C6H14O6 | FBPFZTCFMRRESA-KVTDHHQDSAN | 182.07904 |
| Mannose | glucid | C6H12O6 | WQZGKKKJIFFOK-PQMKYFCFSAN | 180.06339 |
| Melezitose | glucid | C18H32O16 | QWIZNVHXZRPDR-WSCXOGSTSAN | 504.16903 |
| Melibiose | glucid | C12H22O11 | DLRVVLDZNNYCBX-ABXHMFYFSAN | 342.11621 |
| Myo-inositol | glucid | C6H12O6 | CDAISMWEOUEBRE-GPIVLXJGSAN | 180.06339 |
| Quinate | organic acid | C7H12O6 | AAWZDTNXLGCEK-WYWMIBKRSAN | 192.06339 |
| Raffinose | glucid | C18H32O16 | MUPFEKGTMRGPLJ-ZQSKZDJDSAN | 504.16903 |
| Saccharose | glucid | C12H22O11 | CZMRCDWAGMRECN-UGDNZRGBSAN | 342.11621 |
| Sorbitol | glucid | C6H14O6 | FBPFZTCFMRRESA-JGWLITMVSAN | 182.07904 |
| Succinate | organic acid | C4H6O4 | KDYFGRWQOYBRFD-UHFFFAOYSA-L | 118.02661 |
| Trehalose | glucid | C12H22O11 | HDTRYLNUVZCQOY-LIZSDCNHSAN | 342.11621 |
| Xylitol | glucid | C5H12O5 | HEBKCHPVOIAQTA-NGQZWQHPSAN | 152.06847 |
| Xylose | glucid | C5H10O5 | SRBFZHDQGSBBOR-IOVATXLUSAN | 150.05282 |

doute au travers du choix des extractants et des technologies de détection) ont également été mises en oeuvre. Les procédures analytiques ciblées sont décrites ci-après.

4.1. Analyse des glucides, de leurs dérivés et des acides organiques libres

Les glucides non structuraux, les polyalcools et les acides organiques bien que peu volatils à l'état natif ont été identifiés et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée à un détecteur à ionisation de flamme (FID) ou à un spectromètre de masse (configurations simple quadripôle ou triple quadripôles). Pour augmenter la volatilité de ces composés et améliorer le pouvoir résolutif de la GC, une étape pré-colonne de dérivation chimique par triméthylsilylation est réalisée. La procédure consiste à ajouter 50 µl d'une solution de pyridine contenant de la méthoxyamine (20 mg.ml⁻¹) aux résidus secs préalablement issus des étapes d'extraction ainsi que dans un tube vide qui sert de « blanc » et dans un tube contenant les composés commerciaux de standardisation à 100 µM (tableau II) pour la procédure de calibration externe. Les préparations sont agitées doucement jusqu'à dissolution complète des résidus secs et placées à 30 °C pendant 90 min. Cinquante µl de BSTFA (N,O-bis(triméthylsilyl) trifluoroacétamide) sont ajoutés avant homogénéisation douce et incubation à 37 °C pendant 30 min. Après stabilisation de la réaction (environ 4 heures à température ambiante) les échantillons sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (Agilent 6890 ; Agilent J&W Capillary GC Column 30 m x 320 µm x 0,25 µm). Le gaz vecteur (Hydrogène) est appliqué à un débit constant de 1,5 ml.min⁻¹ selon le gradient thermique suivant : 70 °C pendant 4 min, + 5 °C.min⁻¹ jusqu'à 300 °C puis 5 min à 300 °C. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont respectivement réglées à 260 °C et 300 °C. La détection des composés silylés est assurée par un détecteur à ionisation de flamme maintenue par un flux continu d'air et d'hydrogène (respectivement 300 ml.min⁻¹ et 30 ml.min⁻¹). L'identité des différents glucides a été confirmée par spectrométrie de masse. Les chromatogrammes sont traités à l'aide du logiciel GC ChemStation (Agilent Technologies révision B.04.03).

4.2. Analyse des acides aminés libres par UHPLC-UV

Les acides aminés libres dans les fractions polaires des extraits sont séparés, identifiés et quantifiés par chromatographie liquide couplée à un détecteur à ultraviolets (LC-UV). Une étape de dérivation pré-colonne s'avère nécessaire pour rendre les acides aminés détectables dans l'ultra-violet par couplage d'un fluorophore sur la fonction amine

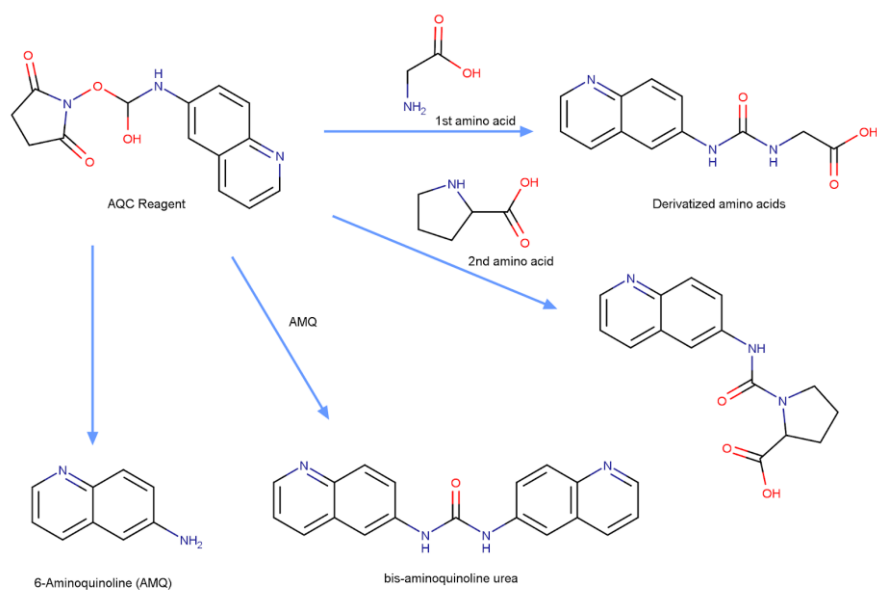


Figure 39 : Réactions de dérivation des groupement amines primaires et secondaires des acides aminés par le kit AccQ-Tag® de Waters.

Tableau III : Paramètres d'éluion chromatographique utilisés pour la séparation des acides aminés par UHPLC. Le solvant A correspond à l'éluant AccQ-Tag® et le le solvant B à de l'ACN.

| Temps (min) | Débit (mL/min ⁻¹) | %A | %B |
|-------------|-------------------------------|----|----|
| 0 | 0.4 | 98 | 2 |
| 0.2 | 0.4 | 98 | 2 |
| 3 | 0.4 | 38 | 62 |
| 8 | 0.4 | 10 | 90 |
| 9 | 0.4 | 10 | 90 |
| 10 | 0.4 | 98 | 2 |
| 11 | 0.4 | 98 | 2 |

primaire ou secondaire (figure 39). Cette étape est réalisée en suivant les consignes de la procédure commerciale AccQ-Tag® (Waters Corporation, USA) à partir des fractions polaires extraites et asséchées sous vide. Dans un premier temps, les résidus secs sont remis en suspension dans 50 µl d'eau ultra-pure et placés dans une cuve à ultrasons pendant 5 min. Ensuite, 5 µl des suspensions resolubilisées sont ajoutés à 35 µl d'une solution tamponnée de borate de sodium (AccQ-Tag kit, Waters), puis 10 µl de réactif AccQ-Tag® sont délivrés dans chacun des tubes. Les préparations sont homogénéisées puis centrifugées et placées au bain-marie pendant 10 min à 55 °C avant d'être transférées dans des fioles adaptées à l'injecteur automatique du système UHPLC (Acquity UPLC, Waters ; Colonne : Acquity UPLC® BEH C18 1,7 µm 2,1x100 mm) couplé à un détecteur à barrette de diodes (DAD, Waters). La séparation chromatographique est réalisée à partir de deux éluants (A : AccQ-Tag® Ultra Eluent ; B : Acétonitrile) à un débit constant de 0.7 ml.min⁻¹ en suivant le gradient indiqué dans le tableau III. Les composés sont détectés par lecture de l'absorbance par spectrophotométrie à 260 nm. Les chromatogrammes sont traités à l'aide du logiciel Empower 2 (Waters Software, B.2154). L'identité des analytes, en cas d'incertitude, a pu être confirmée par couplage du système analytique à un spectromètre de masse de type quadripolaire (Acquity TQD de Waters) en utilisant les masses des ions fils et parents (tableau IV) comme décrit par (Salazar *et al.*, 2012).

4.3. Analyse des massifs isotopiques des acides aminés libres par spectrométrie de masse (LC-MS)

Afin de suivre et de tracer l'incorporation de marqueurs isotopiques dans les acides aminés, le système de chromatographie liquide UHPLC a été couplé à la spectrométrie de masse de manière à accéder aux isotopologues de chacun des acides aminés. Pour un acide aminé donné, le massif isotopique est constitué par ses différents isotopologues (c'est-à-dire qui ne diffèrent que par la présence d'un ou plusieurs isotopes) et l'enrichissement isotopique (en ¹³C ou ¹⁵N) va ainsi entraîner une modification des ratios entre les différents isotopologues mesurés. De cette manière, l'incorporation des isotopes dans tel ou tel acide aminé pourra ainsi être mesurée. Les méthodes de dérivation et de chromatographie utilisées sont identiques à celle présentées dans la partie précédente. Les massifs isotopiques ont été mesurés en mode Selected Ion Recording (SIR) sur un spectromètre de masse de type quadripôles (Acquity TQD de Waters) couplé à une source d'ionisation de type électronébuleuseur (ESI) utilisé en mode positif. Pour chacun des acides

Tableau IV : Identifiants KEGG, masse monoisotopique, masse de l'ion positif et masse de l'ion dérivé positif des acides aminés libres quantifiés par LC-ESI(+)-TQD(SIR).

| Amino acid | KEGG ID | Masse monoisotopique | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ dérivé |
|---------------------|---------|----------------------|--------------------|---------------------------|
| L-Alanine | C00041 | 89.0 | 90.1 | 260.1 |
| L-Arginine | C00062 | 174.1 | 175.1 | 345.1 |
| L-Asparagine | C00152 | 132.1 | 133.1 | 303.1 |
| L-Aspartate | C00049 | 133.0 | 134.0 | 304.1 |
| BABA | | 103.1 | 104.1 | 274.1 |
| beta-Alanine | C00099 | 89.0 | 90.1 | 260.1 |
| L-Cystine | C00491 | 240.0 | 241.0 | 411.0 |
| GABA | C00334 | 103.1 | 104.1 | 274.1 |
| L-Glutamate | C00025 | 147.1 | 148.1 | 318.1 |
| L-Glutamine | C00064 | 146.1 | 147.1 | 317.1 |
| Glycine | C00037 | 75.0 | 76.0 | 246.1 |
| L-Histidine | C00135 | 155.1 | 156.1 | 326.1 |
| L-Hydroxyproline | C01157 | 131.1 | 132.1 | 302.0 |
| L-Isoleucine | C00407 | 131.1 | 132.1 | 302.1 |
| L-Leucine | C00123 | 131.1 | 132.1 | 302.1 |
| L-Lysine | C00047 | 146.1 | 147.1 | 317.1 |
| L-Methionine | C00073 | 149.1 | 150.1 | 320.1 |
| S-Methyl-L-cysteine | C03800 | 135.0 | 136.0 | 306.0 |
| L-Ornithine | C00077 | 132.1 | 133.1 | 303.1 |
| L-Phenylalanine | C00079 | 165.1 | 166.1 | 336.1 |
| L-Proline | C00148 | 115.1 | 116.1 | 286.1 |
| L-Serine | C00065 | 105.0 | 106.0 | 276.1 |
| SMCSO | | 151.0 | 152.0 | 322.0 |
| L-Threonine | C00188 | 119.1 | 120.1 | 290.1 |
| L-Tryptophane | C00078 | 204.1 | 205.1 | 375.1 |
| L-Tyrosine | C00082 | 181.1 | 182.1 | 352.1 |
| L-Valine | C00183 | 117.1 | 118.1 | 288.1 |

aminés, les masses recherchées correspondent à la masse de l'ion majoritaire après dérivation en mode positif, qui correspond également au premier isotopologue ($^{12}\text{C}_5$), ainsi que toutes les masses jusqu'au $[\text{M}+\text{H}]+5$, correspondant à la masse du cinquième isotopologue ($^{13}\text{C}_5$).

4.4. Analyse des phytohormones

Les phytohormones sont quantifiées par UHPLC-ESI(+/-)-MS/MS en mode MRM (multiple reaction monitoring). Les échantillons sont transférés dans des flacons adaptés à l'injecteur automatique pour système UHPLC (Acquity UPLC de Waters ; Colonne : Acquity UPLC® HSS T3 1,8 μm 2,1x150 mm). Les conditions de chromatographie sont décrites dans le [tableau V](#) (Pan *et al.*, 2010). L'analyseur est un spectromètre de masse de type triple quadripôles (Acquity TQD de Waters) qui combine deux analyseurs quadripolaires en série séparés par une cellule de collision. Les ions chargés sont filtrés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) dans le premier quadripôle puis fragmentés dans la cellule de collision. Les fragments d'ions ainsi produits sont filtrés de la même manière dans le second quadripôle avant d'atteindre le détecteur et d'être enregistrés. La possibilité de sélectionner des transitions ioniques (ions parents et ions fils) établies à l'avance et spécifiques des composés à détecter rend cette technologie particulièrement adaptée et sélective pour le dosage de molécules présentes en faible quantité comme les phytohormones. Les paramètres utilisés pour détecter les phytohormones ciblées sont indiqués dans le [tableau VI](#). Les chromatogrammes ont été traités à l'aide du logiciel MASSLynx® (Waters).

4.5. Dosage des glucosinolates

Les glucosinolates sont quantifiés à partir des fractions polaires avec un système UHPLC-MS comme décrit par (Tian *et al.*, 2005) en mode SIR (Selected Ion Recording). La séparation chromatographique est réalisée en utilisant un gradient entre deux solvants : de l'eau acidifiée ($\text{H}_2\text{O}/\text{HCOOH}$; 0.1 % ; V/V) et de l'acétonitrile acidifié (ACN/HCOOH ; 0.1 % ; V/V) sur un système UHPLC (Acquity UPLC de Waters ; Colonne : Acquity UPLC® BEH 1,7 μm 2,1x150 mm) couplée à un détecteur de type quadripôle (Acquity TQD de Waters). Les paramètres chromatographiques sont renseignés dans le [tableau VII](#) et les masses ciblées ainsi que les modalités d'ionisation sont données dans le [tableau VIII](#). Le volume d'injection est de 2 μl avec une tension de capillaire de 2.9 kV, les tensions de cône et de l'extracteur sont réglées respectivement sur 37 V et 3 V, les températures de la

Tableau V : Paramètres d'élution chromatographique utilisés pour la séparation des phytohormones par UHPL. Le solvant A correspond à de l'eau acidifié (0,1 % ; V/V ; acide formique) et le solvant B à du méthanol acidifié (0.1 % ; V/V ; acide formique).

| Temps (min) | Débit (mL.min ⁻¹) | %A | %B |
|-------------|-------------------------------|----|-----|
| 2 | 0.3 | 70 | 30 |
| 20 | 0.3 | 0 | 100 |
| 22 | 0.3 | 0 | 100 |
| 25 | 0.3 | 70 | 30 |

Tableau VI : Caractéristiques d'élution chromatographique, mode d'ionisation ainsi que les paramètres de fragmentation par MS/MS pour les phytohormones ciblées.

| Composé | Abbréviation | Formule | Clé InChI | Masse exacte | Mode | RT | Tension de cone (V) | Energie de collision (V) | Ion parent | Ion fils |
|--|----------------------|------------|------------------------------|--------------|------|------|---------------------|--------------------------|------------|----------|
| 4-aminobenzoic acid | 4 aminobenzoic acid | C7H7NO2 | ALYNCZNDIQEVRV-UHFFFAOYSA-M | 137.0477 | ESI+ | 4.4 | 21 | 18 | 138 | 94 |
| 2-cis,4-trans-Abscisic acid | ABA | C15H20O4 | JLIDBLDQVAYHNE-LXGGSRJLSA-N | 264.1362 | ESI- | 11.7 | 27 | 11 | 263 | 153 |
| 3-thiazol-2'-yl-indole | Camalexine | C11H8N2S | IYODIJVWGPRBGQ-UHFFFAOYSA-N | 200.0408 | ESI- | | | | | 199 |
| Gibberellin A3 | GA3 | C19H22O6 | IXORZMNAPKEEDV-OB DJNFEBSA-N | 346.1416 | ESI- | 9 | 35 | 25 | 345 | 143 |
| Gibberellin A4 | GA4 | C19H24O5 | RSQSQJNRHICNNH-NFMPGMCNSA-N | 332.1624 | ESI- | 14.6 | 33 | 30 | 331 | 213 |
| Indole-3-acetic acid | IAA | C10H9NO2 | SEOVTRFCIGRIMH-UHFFFAOYSA-M | 175.0633 | ESI- | 9.7 | 24 | 12 | 174 | 130 |
| N-(3-Indolylacetyl)-L-alanine | IA-Ala | C13H14N2O3 | FBDCJLXTUCMFLF-QMMMGOBSA-N | 246.1004 | ESI- | 9 | 30 | 17 | 245 | 156 |
| Indole-3-acetamide | I-ACET | C10H10N2O | ZOAMBXDOGPRZLP-UHFFFAOYSA-N | 174.0793 | ESI+ | 7.34 | 19 | 20 | 175 | 130 |
| Indole-3-acetonitrile | IAN | C10H8N2 | DMCPFOBLJMLSX-UHFFFAOYSA-N | 156.0687 | ESI+ | 10.3 | 22 | 19 | 158 | 131 |
| Indole-3-butyric acid | IBA | C12H13NO2 | JTEDVYBZBROSJT-UHFFFAOYSA-M | 203.0946 | ESI- | 12.3 | 29 | 20 | 202 | 157 |
| 1H-Indole-3-carboxylic acid | ICA | C9H7NO2 | KMAKOBLOQCQJJP-UHFFFAOYSA-M | 161.0477 | ESI- | 9.2 | 29 | 18 | 160 | 116 |
| N-(3-Indolylacetyl)-L-leucine | I-Leu | C16H20N2O3 | HCZNPUGHYPPINM-AWEZNQCLSA-N | 288.1474 | ESI- | 13 | 35 | 24 | 287 | 130 |
| Isopentenyladenine | iP | C10H13N5 | HYVABZIGRDEKCD-UHFFFAOYSA-N | 203.1171 | ESI+ | | | | | 204 |
| Isopentenyladenosine | iPR | C15H21N5O4 | USVMJSALORZVDV-SDBHATRESA-N | 335.1594 | ESI+ | 10.5 | 22 | 28 | 336 | 204 |
| Indole-3-pyruvic acid | I-PY | C11H9NO3 | RSTKLPZEZYGQPY-UHFFFAOYSA-M | 203.0582 | ESI+ | | | | | 204 |
| Jasmonic acid | JA | C12H18O3 | ZNJFBWYDHIGLCU-HWKXXFMVSA-M | 210.1256 | ESI- | 12.8 | 25 | 24 | 209 | 59 |
| (-)-jasmonoyl-L-isoleucine | JA-Ile | C18H29NO4 | IBZYPBGOGJMBF-QMAGESQGSAM | 323.2097 | ESI- | 14.9 | 22 | 32 | 322 | 130 |
| Methyl jasmonate | Me-JA | C13H20O3 | GEWDNTWNSAZUDX-WQMVXFAESA-N | 224.1412 | ESI+ | 14.7 | 20 | 13 | 225 | 151 |
| N-acetyl-L-ornithine | N acetyl L ornithine | C7H14N2O3 | JRLGPAXAGHMNOL-LURJTMIESA-N | 174.1004 | ESI- | | | | | 173 |
| 13-epi-12-oxo-phytodienoic acid | OPDA | C18H28O3 | PMTMAFAPLCGXGK-CLTKARDFSA-M | 292.2038 | ESI- | 17.3 | 36 | 24 | 291 | 165 |
| 2-Hydroxybenzoic acid | SA | C7H6O3 | YGSDEFMJLZEOE-UHFFFAOYSA-M | 138.0317 | ESI- | 10.1 | 21 | 24 | 137 | 93 |
| (E)-2-methyl-4-(1H-purin-6-ylamino)-2-buten-1-ol | Zeatin | C10H13N5O | UZKQTCBAMSWPJD-FARCUNLSSA-N | 219.1120 | ESI+ | 5.1 | 28 | 20 | 220 | 136 |
| Trans-zeatin riboside | Zeatin.R | C15H21N5O5 | GOSWTRUMMSCNCW-HNNGNKQASAN | 351.1543 | ESI+ | | | | | 352 |

source et de désolvatation sont respectivement de 260 °C et 400 °C. Une solution de standards à 250 nmol.ml⁻¹ (Glucoiberin, Glucoerucin, Glucobrassicin, Gluconasturtiin, Glucoraphanin, Glucoraphenin, Glucoalyssin, Sinigrin, Glucobrassicinapin et Progoitrin) est injecté tous les 5 échantillons à différentes concentrations (1/3, 1/5, 1/10 et 1/50) et sert de gamme étalon. Les chromatogrammes ont été traités à l'aide du logiciel MASSLynx® (Waters).

5. Profilage métabolique non ciblé

5.1. Analyse par LC-HRMS

Le profilage métabolique non ciblé consiste à construire la signature métabolique d'un tissu, la plus informative possible et sans *a priori*. C'est une approche qui a été beaucoup développée ces dernières années grâce au recours à la spectrométrie de masse à haute résolution et à la RMN. Le système analytique utilisé pour l'étude est de type UHPLC-HESI(+/-)-Orbitrap. La séparation chromatographique a été réalisée sur un système d'UHPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher, USA) équipé d'une colonne C18 en phase inverse (Hypersil Gold C18, 2.1 mm x 100 mm, 1.9 µm particle size, Thermo Fisher, USA) maintenue à 35 °C. La phase mobile utilisée correspond à un mélange de deux solvants (solvant A : H₂O:CH₃COOH ; 99:1 ; v:v et solvant B : ACN:CH₃COOH ; 99:1 ; v:v). Un gradient linéaire a été appliqué à un débit de 0,4 ml.min⁻¹ commençant par 5 % du solvant B pendant 2,4 min, 25 % à 4.5 min, 70 % à 11 min, 100 % à 14 min et enfin 5 % de la 19^e à la 25^e minute. Le système UHPLC a été couplé à un spectromètre de masse de format quadrupôle hybride de type Orbitrap (Q Exactive™, Thermo Fisher Scientific) équipé d'une source d'ionisation chauffée de type électronébuliseur (HESI). La tension de cône a été réglée à -3.0 kV en mode d'ionisation négatif et 3.0 kV en mode positif. Les débits d'azote ont été réglés à 55 u.a. pour la gaine et 10 u.a. pour l'auxiliaire. La température du capillaire a été maintenue à 350 °C et le four à 300 °C. Un mode de commutation de polarité a été utilisé sur une plage de 65 à 975 m/z avec une résolution de 70 000 à la largeur à mi-hauteur (FWHM). Une calibration externe du détecteur a été réalisée toutes les 24 heures avec des solutions de calibrations pour les modes d'ionisation positif et négatif (Pierce™ LTQ Velos ESI positive et negative respectivement).

Juste avant les analyses, 10 µl de la fraction polaire asséchée de l'extrait ont été dissous dans 1 ml d'un mélange ACN:H₂O (1:1, v:v) puis 5 µl de l'extrait dilué ont été injectés dans le système UHPLC-HRMS. Afin d'éviter les sources d'artéfacts liées à l'encrassement de

Tableau VII : Paramètres d'élution chromatographique utilisés pour la séparation des glucosinolates par UHPLC avec un mélange de deux solvants : de l'eau acidifiée (solvant A : H₂O/HCOOH ; 0.1% ; V/V) et de l'acétonitrile acidifié (solvant B : ACN/HCOOH ; 0.1% ; V/V).

| Temps (min) | Débit (mL/min ⁻¹) | %A | %B |
|-------------|-------------------------------|----|----|
| 0 | 0.4 | 98 | 2 |
| 0.2 | 0.4 | 98 | 2 |
| 3 | 0.4 | 38 | 62 |
| 8 | 0.4 | 10 | 90 |
| 9 | 0.4 | 10 | 90 |
| 10 | 0.4 | 98 | 2 |
| 11 | 0.4 | 98 | 2 |

Tableau VIII : Caractéristiques d'élution chromatographique (RT : temps de rétention), mode d'ionisation ainsi que les masses des parents pour les glucosinolates ciblées par UHPLC-ESI-MS.

| Composé | Clé InChI | Ionisation | m/z | RT |
|-------------------------|-----------------------------|------------|-----|------|
| 4-methoxyglucobrassicin | IIAGSABLXRZUSE-UFRBAHOGSA-N | negatif | 477 | 4.5 |
| 3OHP/Glucosylsymbirin | WMJAKSMGNADDKY-QTCACZPWSA-N | negatif | 376 | 2.01 |
| Glucoalyssin | HUCGRJSHMZWRQQ-LJBAHSCYSA-N | negatif | 450 | 2.43 |
| Glucoberteroin | MEFPHTVXBPLRLX-CBEPRAPJSA-M | negatif | 434 | 4.56 |
| Glucobrassicinapin | XMJFVIGTHMOGNZ-URYVQPGZSA-N | negatif | 386 | 3.76 |
| Glucobrassicin | DNDNWOWHUWNBCK-JZYAIQKZSA-N | negatif | 447 | 4.32 |
| Glucoerucin | GKUMMDFLKGFKH-URYVQPGZSA-N | negatif | 420 | 3.93 |
| Glucohesperin | OOGAQHVYHLPICD-YFJRZMFSM-M | negatif | 464 | 2.76 |
| Glucohirsutin | GPMDJOOLATZDQL-OTNWBXTQSA-N | negatif | 492 | 3.8 |
| Glucoibarin | LQZALQLZOQFGM-CMMZSJMSA-M | negatif | 478 | 3.33 |
| Glucoiberin | PHYADMVYQURSX-GEINXPCQSA-N | negatif | 422 | 1.98 |
| Glucoiberberin | ZCZCVJVUJGULMO-ZHVGPZTNSA-N | negatif | 406 | 3.37 |
| Glucolesquerellin | ZAKICGFSIJSF-LPUQOGTASA-N | negatif | 448 | 5.25 |
| Gluconapin | PLYQBHVYUJNQB-ZHVGPZTNSA-N | negatif | 372 | 3.12 |
| Gluconasturtiin | CKIJGYDFNXSET-LFHLZQBKSA-N | negatif | 422 | 4.63 |
| Glucoraphanin | GMLLNKINDDUDCF-SISVVIKZSA-N | negatif | 436 | 2.16 |
| Glucoraphenin | ZFLXCZJBYSKUSK-HFUPMICZSA-N | negatif | 434 | 2.22 |
| Glucotropaeolin | QQGLQYQXUKHWPX-LPUQOGTASA-N | negatif | 408 | 3.89 |
| Neoglucobrassicin | PKKMITFKYRCCOL-JMZFNCQSA-N | negatif | 477 | 5.25 |
| Progoitrin | MYHSVHWQEVDFQT-ILPXZUKPSA-N | negatif | 388 | 2.32 |
| Sinigrin | PHZOWSSBXJXFOR-PTGZALFTSA-M | negatif | 358 | 2.5 |

la source et aux variations entre les séquences d'analyses, les échantillons ont été injectés aléatoirement et un contrôle qualité (QC) a été intercalé tous les 5 échantillons. Le contrôle qualité correspond à un mélange de l'ensemble des fractions polaires des échantillons biologiques étudiés.

5.2. Traitement des données

Le traitement des données issues d'une analyse non ciblée par UHPLC-HRMS nécessite plusieurs étapes de traitement bio-informatique dont le paramétrage et les outils vont être spécifiques aux échantillons, méthodes et technologies utilisés. Un workflow complet en 9 étapes, de l'acquisition à l'interprétation biologique en passant par le stockage et la compression des données a été décrit par (Gorrochategui *et al.*, 2016). Ce workflow a servi de base pour développer une méthode d'analyse adaptée aux profilages non ciblés de feuilles de colza (figure 40). Les fonctions R développées dans le cadre de la thèse sont disponibles dans le module « Sdjoygret » sur *github.com*. **La première étape** a consisté à convertir les données du système d'acquisition au format « mzXML », qui est un format ouvert compatible avec la plupart des outils de traitement, en utilisant Msconvert (Chambers *et al.*, 2012). Les données correspondant aux deux modes d'ionisation (positif et négatif) sont séparées pour pouvoir être traitées séparément par la suite. **La seconde étape** a consisté à extraire les aires de tous les composés détectables dans chacun des jeux de données. Elle se découpe en plusieurs sous-étapes qui ont été réalisées sous l'environnement R 3.3.0 (R Development Core Team, 2008) avec les modules « IPO » (Libiseller *et al.*, 2015) et « XCMS 3.0.0 » (Tautenhahn *et al.*, 2008) : (1) la sélection des paramètres optimaux avec le modules « IPO », (2) l'identification des pics chromatographiques dans chaque échantillon, (3) le regroupement des pics communs entre les échantillons, (4) le réalignement des temps de rétention, (5) le remplissage des pics manquants par du bruit de fond. L'étape d'optimisation a été ajustée manuellement afin de s'assurer que le maximum de pics a été intégré en utilisant l'indice PPS qui correspond au rapport entre les pics fiables (c'est à dire ceux qui sont accompagnés par leur isotopologues) et le nombre total de pics détectés. L'intégration des pics connus (les standards internes) ainsi que des pics majoritaires a été vérifiée manuellement pour confirmer le bon déroulement de cette étape. La deuxième étape a été terminée par l'annotation des isotopes et adduits en utilisant le modules « CAMERA » (Kuhl *et al.*, 2012) suivi du recoupement entre les données acquises en mode positif et celles acquises en mode négatif. A la fin de la deuxième étape, un tableau contenant les aires des pics pour

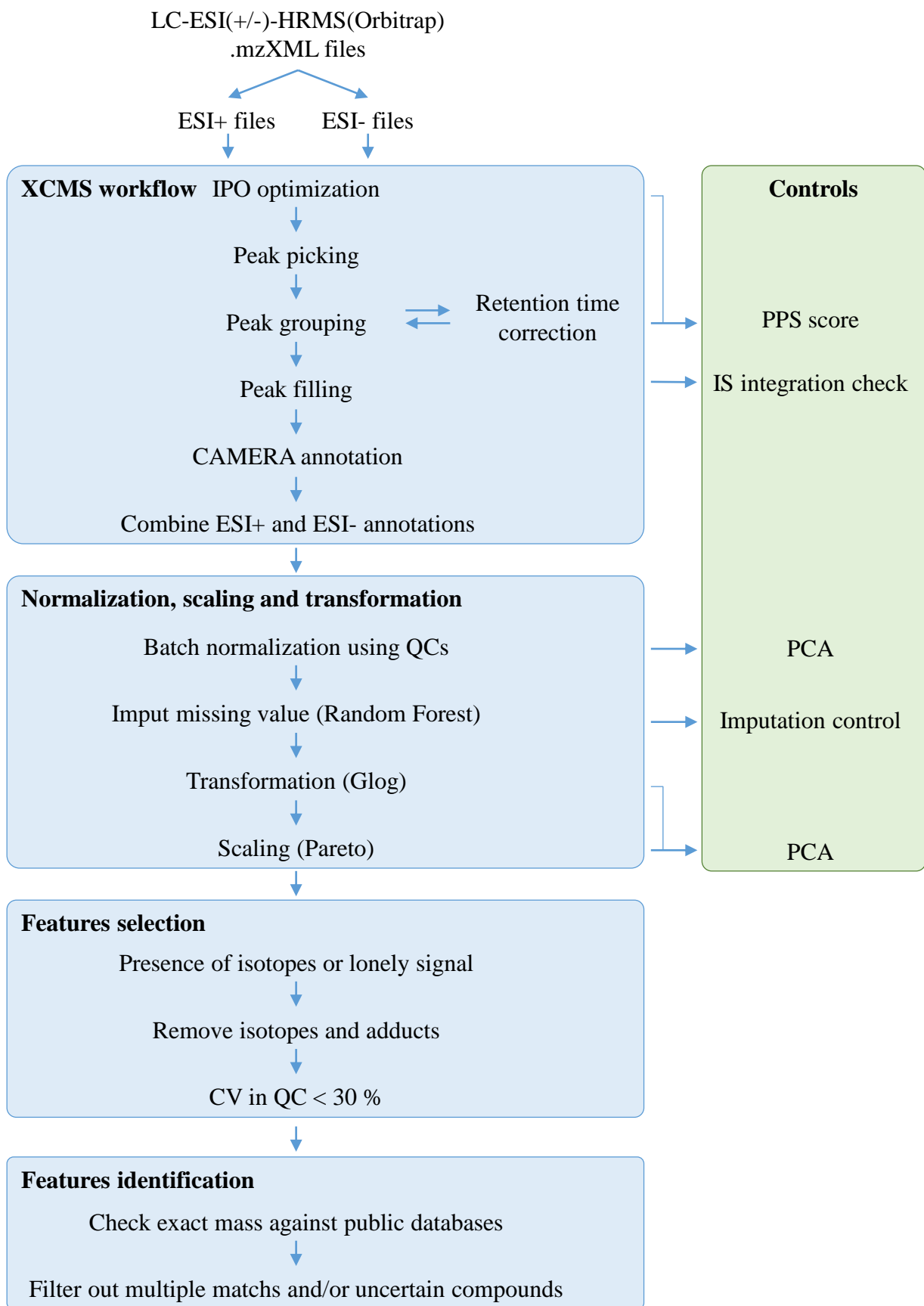


Figure 40 : Diagramme résumant les étapes réalisées pour l'analyse des données de métabolomique non ciblée acquises par spectrométrie de masse à haute résolution. L'ensemble des étapes a été réalisé sous R 3.4.2 avec l'environnement RStudio 1.1.383, sauf l'étape de normalisation en utilisant les QCs qui a été réalisée avec l'outil 'Workflow 4 Metabolomics'.

chacun des échantillons est obtenu et associé à un tableau contenant les informations (masses, temps de rétention, annotations, mode de détection) pour chacun des pics. Chaque pic est unique par la combinaison de sa masse et de son temps de rétention, on parle alors de « Metabolite features », « features » ou « masstags ». **La troisième étape** a consisté à normaliser (Dunn *et al.*, 2011), remplacer les valeurs manquantes, transformer et mettre à l'échelle les données (Di Guida *et al.*, 2016) pour optimiser les analyses statistiques qui vont suivre et soustraire différents biais. Elle se sépare en 4 sous-étapes : (1) la correction de la déviation inter et intra-séquences d'analyses réalisée avec l'outil « Workflow 4 Metabolomics » (Giacomoni *et al.*, 2015) en utilisant la méthode « QC-RLSC », (2) le remplacement des valeurs manquantes en utilisant la méthode « Random Forest », (3) la transformation des données avec la fonction log généralisée (glog) (Pedreschi *et al.*, 2008) et (4) la mise à l'échelle avec la méthode « Pareto » (Eriksson, 1999). **La quatrième étape** a consisté à appliquer une série de filtres pour ne conserver que les features stables et reproductibles : (1) les features accompagnées d'un ou plusieurs isotopologues sont considérées comme fiables et conservées, (2) les features identifiées comme étant des isotopes ou des adduits sont retirés et (3) les features restantes qui ont un coefficient de variation (CV) dans les QCs supérieur à 30 % sont également supprimées. **La cinquième étape** a consisté à rechercher les biomarqueurs en combinant les analyses discriminantes (OPLS-DA) aux tests de probabilités (test de Wilcoxon). Finalement la sixième étape a consisté à identifier les features correspondant à des biomarqueurs en recherchant leur masse exacte sur les bases de données en ligne (Fukushima et Kusano, 2013). Les identifications doivent ensuite être vérifiées manuellement pour s'assurer d'obtenir des identifiants fiables. Par exemple, lorsqu'il y a plusieurs molécules qui pourraient correspondre à une feature et qu'elles ont déjà été identifiées chez le colza, alors l'identification n'est pas fiable et n'est donc pas conservée. Une fois les métabolites d'intérêts identifiés, l'interprétation biologique est réalisée en recoupant les données connues des différentes voies métaboliques en lien avec la problématique considérée.

6. Profilage de l'expression des gènes

6.1. Extraction des ARNs, DNase et transcription inverse

Les mesures du niveau d'expression des gènes a été réalisé par PCR en temps réel (qPCR) comme décrit par (Faës *et al.*, 2015a). L'extraction des ARNs totaux a été réalisée à partir de 150 mg de tissus congelés et broyés comme décrit par (Verwoerd *et al.*, 1989). La

Tableau IX : Séquences des couples d'amorces utilisés pour mesurer les niveaux d'expression.

| Gene | Références | Séquences des amorces | Type d'amorce |
|------------------|---------------------|--------------------------|-------------------|
| Cab LHCII Type I | AY288914 | GGCAGCCCATGGTACGGATC | qRT-PCR Forward |
| | | CCTCCITCGCTGAAGATCTGT | qRT-PCR Reverse |
| SAG12-1 et -2 | AF089848 | GTTTTGTTTAGCCAAAGTCAAACA | qRT-PCR Forward |
| | AF089849 | CGGCGGAAGATTGGCT | qRT-PCR Reverse |
| BnaA&C.ProDH1a | KM284681 ; KM284682 | ACGCACGATTGCTACAATA | qRT-PCR Forward |
| | | AAACTCTATCTCCCGTTCTC | qRT-PCR Reverse |
| BnaA&C.ProDH1b | KM284683 ; KM284684 | AGCAGCAAAATCCTTACCT | qRT-PCR Forward |
| | | CTTCCACGAGAGTTTAAAAT | qRT-PCR Reverse |
| BnaA&C.ProDH1c | KM284685 ; KM284686 | ATTGAAGCTGCCAAGTCC | qRT-PCR Forward |
| | | GTTCCCAACGAAGCAAGT | qRT-PCR Reverse |
| BnaA.ProDH2a | KM284687 | GTGAGGAGCGTGTATGAGTC | qRT-PCR Forward |
| | | ACAAATGGCTGTGATCTTAAC | qRT-PCR Reverse |
| BnaC.ProDH2a | KM284688 | CGTGAGGAGTGTGTATGAGTT | qRT-PCR Forward |
| | | GACAAATCGCTGTGATCTTAAT | qRT-PCR Reverse |
| BnaX.PP2A.a | | GCTTCAATCCCTCATTCCAA | Référence Forward |
| | | ATCCTCGCTTAGCTCCACAA | Référence Reverse |
| BnaX.PTB.a | | AGCGAAAGAAGCATTGGAAG | Référence Forward |
| | | CAGGAGTAGGCTCAGATCAGG | Référence Reverse |
| BnaX.UBC21.a | | GTCCTCTCAACTGCGACTCA | Référence Forward |
| | | GTGTGTACATGCGTGCCATT | Référence Reverse |

quantité et la qualité des ARNs a été évaluée par spectrophotométrie avec un NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Etats-Unis). L'ADN génomique résiduel a été dégradé en appliquant un traitement DNase en suivant les instructions du fabricant (DNase I, Thermo Fisher Scientific Inc., Etats-Unis). Les ADNs ont été synthétisés à partir de 1 µg d'ARNs traité à la DNase avec une reverse transcriptase issue du virus de la leucémie murine (M1701, Promega, Etats-Unis) et des oligo(dT)12-18 (C1101, Promega, Etats-Unis) en suivant les instructions du fabricant.

6.2. Real-time PCR quantification

Les niveaux d'expression du gène de Cab LHCII type I (CAB ; AY288914), des deux gènes SAG (SAG12-1 : AF089848 et SAG12-2 : AF089849) et de BnaA&C.ProDH1a, BnaA&C.ProDH1b, BnaA&C.ProDH1c, BnaA.ProDH2a et BNaC.ProDH2a de *B. napus* ont été mesurés par qPCR comme décrit par (Gombert *et al.*, 2006) et modifié par (Faës *et al.*, 2015b). Les réactions ont été réalisées pour chaque couple d'amorce (tableau IX) avec le kit Light Cycler 480 SYBR Green I Master mix (#04887352001, Roche Applied Science, Germany), sur un système LightCycler 480 (Roche Applied Science) dans les conditions suivantes : une étape préliminaire (10 min à 95 °C) suivie de 45 cycles (10 s à 95 °C, 20 s à 60 °C, 10 s à 72 °C). Les gènes BnaX.PP2A (*Arabidopsis* ortholog At1g13320), BnaX.PTB (polypyrimidine tract-binding) et BnaX.UBC21 (ubiquitin-conjugating enzyme 21) ont été utilisés comme référence (Chen *et al.*, 2010).

6.3. Profilage transcriptomique

Le profilage transcriptomique a été réalisé par la méthode de microarrays sur une puce BRSIK60K (expression de gène eucaryote en 3', Affymetrix, Etats-Unis) comprenant 61 131 sondes de *B. napus* (80 %), *B. rapa* et *B. oleracea*. Les procédures de purification des ARN, la préparation des sondes cDNA, l'hybridation ainsi que la lecture des microarrays ont été réalisées par Biogemma (France). Brièvement, l'extraction des ARNs a été réalisée avec le kit « SV96 Total RNA Isolation Kit » (Promega, Etats-Unis) selon la procédure décrite par le fabricant. La qualité des extractions a été vérifiée avec deux indicateurs : (1) le rapport entre les sous-unités ribosomales 28S et 18S par électrophorèse capillaire et (2) le rapport entre l'absorbance à 260 nm et 230 nm par spectrophotométrie. Les extraits avec un rapport 28S/18S proche de 2 et un rapport A260/A230 proche de 1 ont été utilisés pour l'hybridation. Les sondes ont été réalisées avec le kit « 3' IVT Express Kit » (Affymetrix #901229) puis fragmentées pour obtenir des fragments moyens de 100 nt.

Chaque échantillon a été hybridé pendant 16 h à 45 °C, rincé puis coloré avec le kit « Hybridization, Wash and Stain Kit » (Affymetrix #900720). Les données obtenues ont ensuite été normalisées en utilisant la méthode du « robust multichip average » (RMA).

CHAPITRE 1

RÉORGANISATION SPATIALE ET TEMPORELLE DU MÉTABOLISME AU COURS DU DÉVELOPPEMENT FOLIAIRE DU COLZA D'HIVER

1. Introduction

2. Metabolome reconfiguration of leaf development,
sink/source transition and senescence in *Brassica
napus L.* (Article)

3. Cartographie spatiale et temporelle du
métabolisme associé à la sénescence foliaire

CHAPITRE 1 : RÉORGANISATION SPATIALE ET TEMPORELLE DU MÉTABOLISME AU COURS DU DÉVELOPPEMENT FOLIAIRE DU COLZA D'HIVER

1. Introduction

L'efficacité d'utilisation de l'azote par la plante, nous l'avons vu, repose notamment sur les propriétés de re-valorisation de ressources organiques préalablement assimilées. Cette propriété s'applique à d'autres éléments assimilables comme le carbone, le soufre ou le phosphore. Le recyclage nutritionnel de la biomasse est largement inféodé au cycle de développement des différents organes et aux relations trophiques établies entre les tissus sources et les tissus puits. Les organes foliaires assurent la majeure partie des fonctions d'assimilation des nutriments et constituent, pendant la phase végétative de croissance, des zones d'échanges intensifs de matière organique via les conductions phloémiennes, et pendant la phase reproductrice une source trophique essentielle au remplissage des fruits et de graines. L'induction et la progression de la sénescence conditionnent notamment l'accélération des flux des nutriments organiques sous-tendus par des structures métaboliques adaptées au recyclage et à la réallocation de ces éléments nutritionnels vers des formes remobilisables à distance. L'environnement abiotique et biotique de la plante va largement interférer sur ces fonctions nutritionnelles en affectant son programme développemental, en pénalisant potentiellement, directement ou indirectement, l'accès aux nutriments et en sollicitant le métabolisme vers des ajustements interactifs et possiblement compétitifs. Le micro-environnement qui va accompagner les étapes d'émergence, d'expansion, de maturation et de vieillissement des tissus foliaires, à l'échelle de la canopée constitue également un élément de contexte déterminant de la régulation des fonctions de nutrition.

En termes d'ambitions, il a été précisé combien il semble essentiel de pouvoir délimiter, chez le colza, les caractères génétiques, physiologiques et métaboliques qui soutiennent ces processus de remobilisation de l'azote organique (mais aussi du carbone, du soufre et

du phosphore) en lien avec des objectifs de sélection pour l'amélioration de l'efficacité globale d'usage de ces éléments et la perspective d'optimiser le bilan énergétique et de diminuer l'empreinte environnemental des productions. De telles prétentions passent notamment par la décomposition des mécanismes moléculaires qui supportent ces processus biochimiques de remobilisation métabolique. En ce sens, nous avons fait le choix d'entreprendre une description aussi affinée que possible, dans le temps et dans l'espace, du phénotype métabolique des tissus foliaires de colza intégrés au fonctionnement global de la plante. La capacité à définir les ajustements métaboliques qui opèrent au cours du développement de ces organes aux différentes étapes qui conditionnent leur statut de puits, de transition source/puits et enfin de sénescence offre la possibilité de circonscrire les réseaux et les nœuds métaboliques sur lesquels intervenir pour en améliorer les performances.

Ce premier chapitre contribue donc à disséquer, par des approches de métabolomique ciblée et non ciblée, les caractéristiques métaboliques des tissus foliaires de colza au cours de leur développement. Le choix a été fait, afin de donner plus de profondeur analytique aux travaux, de focaliser ici sur la phase de développement végétatif de la plante au cours de laquelle s'établit naturellement un gradient développemental entre les différents étages foliaires et des relations trophiques interactives. Un seul génotype a été manipulé, dans un premier temps. Son choix a été conditionné à la quantité d'informations acquises par ailleurs, sur les plans génomique, transcriptomique et phénotypique, quant à sa réactivité à la fertilisation azotée. Les plantes ont été conduites en conditions contrôlées, sans pénalité nutritionnelle et dans des conditions de développement (densité) et d'accès à la ressource lumineuse non limitante. La première partie, sous la forme d'un article scientifique, établit l'évolution physiologique et biochimique des tissus foliaires au cours de leur développement et la définition métabolique des différentes phases et des étapes qui délimitent les fonctions de nutrition (puits ; transitions puits/sources ; remobilisation). Alors que ces analyses sont réalisées à ce stade, à l'échelle du limbe entier, à différents étages de l'axe de la plante, la deuxième partie de ce chapitre fait référence à une analyse spatiale plus fine visant à décrire la progression métabolique qui opère le long de l'axe longitudinal de la feuille en développement depuis l'apex vers la base. Enfin, la dernière partie, a vocation également à spatialiser la définition de phénotype métabolique de la feuille en développement en offrant une image des profils métaboliques établis à différents stades à l'échelle du limbe, des nervures principales et des exsudats phloémiens.

2. Metabolome reconfiguration of leaf development, sink/source transition and senescence in *Brassica napus* L.

Sylvain Dechaumet¹, Yann Guitton², Patrick Leconte¹, Sophie Rolland¹, Françoise Leprince¹, Nathalie Marnet³, Solenne Berardocco¹, Catherine Jonard¹, Bruno Le Bizec², Françoise Le Caherec¹, Nathalie Nesi¹ and Alain Bouchereau^{1*}

¹ Institute for Genetics, Environment and Plant Protection (IGEPP), UMR1349 INRA-Agrocampus Ouest-Université de Rennes 1, 35653 Le Rheu cedex, France

² Oniris, LUNAM, Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), BP50707 - 44307 Nantes Cedex 3, France

³ Unité Biopolymères Interactions Assemblages (BIA), INRA, UR1268, BP35327, 35653 Le Rheu Cedex, France

Abstract

Winter oilseed rape, the main European oleaginous crop, is mainly grown for its seeds and extraction of edible oil and biofuel, while the residual protein meal is also used for animal feed. It is a very high nitrogen (N)-fertilizer consuming species characterized by a rather low N use efficiency (NUE). To meet the current challenges of agroecology and sustainable agriculture through input limitation, improvement of N remobilization efficiency during leaf senescence is likely to improve significantly the overall plant NUE, particularly in oilseed rape where organic N recycling between source and sink tissues is rather inefficient. Thus, metabolic profiling explorations have been undertaken in relation to leaf development and resource allocation at the whole plant level for the comprehensive understanding of sink and source metabolome and senescence-associated metabolic adjustments. Our study focused on quantitative analysis of primary C and N polar metabolites, as they are fundamental attributes of nutrient assimilation and recycling. Concurrently a holistic non-targeted metabolomic approach through high resolution mass spectrometry has carried out in order to decipher leaf ageing imprinting on leaf metabolic networks. The work relates and discusses acquired results after metabolite profiling data were integrated into exploratory multivariate statistical analyses. Leaf development-dependent metabolic signatures have been pointed out and clusters of metabolic indicators could be assigned to early expansion and growing processes, sink/source status, senescence progression and leaf micro-environment along the plant axis.

Key words: Oilseed rape; nutrient remobilization efficiency; leaf metabolome; leaf age and position; biomarkers

2.1. Introduction

Leaf senescence in plants, as the ultimate stage of growth and development, is functionally defined by the transition from net nutrient assimilation to nutrient remobilization (Masclaux *et al.*, 2000). This shift is under close intrinsic and external regulations and is characterized by major cellular changes such as a decrease in photosynthetic activity, the dismantling of intracellular structures and degradation of proteins and other macromolecules, from which recycled nutrients will be translocated to sink organs (Havé *et al.*, 2017). The efficiency of those processes are not only determinant for plant development and reproductive success but also critical in crop species for yield elaboration and stress acclimation/adaptation (Masclaux *et al.*, 2000). Nutrient use efficiency as a combination of nutrient uptake and nutrient utilization performance is tightly associated to developmental events and remobilization efficiency is clearly dependent on leaf senescence-driven metabolite recycling, partitioning and allocation. Whole plant monocarpic senescence occurs during flowering and is characterized by a massive remobilization of nutrients from vegetative tissues to the flowers, fruits and seeds (Rossato *et al.*, 2001). In contrast, sequential senescence occurs gradually during the vegetative stages and uses older tissues to feed growing developing ones, leading in some cases to the fall of older organs (Avice and Etienne, 2014).

In winter oilseed rape (*Brassica napus L.*), yield is determined by numerous genetic, environmental and agronomic factors. As the most cultivated crop for edible seed oil production and seed meal for animal feeding in Europe, parsimonious management of input-fertilization and pesticides is determinant to reduce the economic and environmental impact of crop production (Diepenbrock, 2000; Bouchet *et al.*, 2016) and nitrogen (N)-fertilizer regime is under special focus. As an oleoproteaginous crop, carbon (C) and N-use efficiencies are major determinants of seed yield and quality. As a Brassicaceae, *B. napus* also has large requirements for sulfur (S) although modern cultivated varieties have a limited content of S compounds (i.e. glucosinolates) deposited in seed. One of the main concerns lies in its low N use efficiency (NUE) attributed to high nitrogen needs for vegetative growth, low nitrogen harvest index combined with low remobilization efficiency and premature defoliation (Rossato *et al.*, 2001; Albert *et al.*, 2012; Bouchet *et al.*, 2016). A lot of effort is being made either to optimize the

cultural/fertilization techniques (Rathke *et al.*, 2006; Stahl *et al.*, 2015) or towards the selection of more nutrient-use efficient oilseed rape varieties (Bouchet *et al.*, 2014; Nyikako *et al.*, 2014), but still remains unsatisfactory. Winter oilseed rape accumulates 25 to 30 % of the total N-uptake from the soil during autumn (Cramer, 1993). Subsequent N-uptake is high until flowering but low during the reproductive phase associated with an incomplete N-remobilization and translocation between vegetative organs during sequential senescence and to seed during monocarpic senescence (Rathke *et al.*, 2006). Thus the underlying physiological and molecular mechanisms governing metabolic source/sink transitions and senescence-induced and -regulated remobilization, allocation and partitioning processes, remain to be clarified as relevant traits for breeding.

A comprehensive transcript profiling study during the development and the whole lifespan of an *Arabidopsis* leaf has been reported (Breeze *et al.*, 2011) and spatiotemporal metabolic shifts in primary, secondary, and lipid metabolism during leaf developmental senescence in *A. thaliana* have been recently highlighted (Watanabe *et al.*, 2013). Metabolomic investigations of leaf ageing under natural conditions have also been described in tobacco (Li *et al.*, 2016) and sunflower (Moschen *et al.*, 2016). Those studies confirm the overall complexity of leaf senescence and highlight temporal regulation of major processes like primary metabolism, pigment turnover, hormonal regulation and oxidative stress responses in leaves during ageing. Furthermore, differences in developmental chronology were observed between basal and apical parts of a single leaf and the basipetal progression of senescence was reflected in terms of metabolic adjustments (Watanabe *et al.*, 2013). Very recently, in oilseed rape, through a comparative exploration of metabolism reconfiguration in both laminae and midvein during leaf ageing, clear distinctive metabolic profile evolution suggested that midvein may contribute to metabolite partitioning before sink allocation (Clément *et al.*, 2018). From these informative blueprint studies, more detailed ones are now needed to tightly screen for metabolic changes that accompany leaf developmental stages especially those controlling early events of development, source/sink transition, senescence induction and ageing progression. This will help us elucidate metabolic signatures, network rearrangements and putative metabolic control associated to nutrient allocation, recycling and remobilization that may serve as levers for nutrient use efficiency improvement. Therefore, we performed a refined metabolomic profile monitoring of oilseed rape leaf development and sequential vegetative senescence through targeted and nontargeted metabolite exploration of whole leaves of increasing ages and all nodal

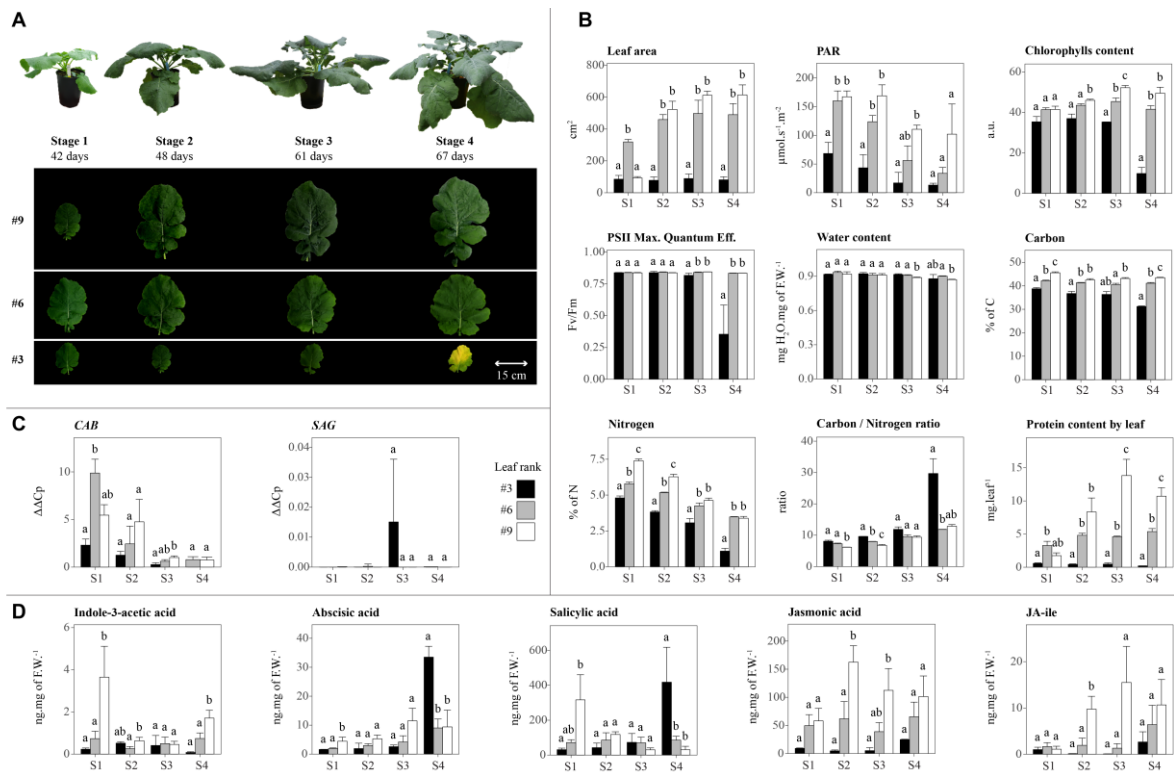


Figure I-1 : Physiological and molecular characterization of leaf development during the experiment. A: Each leaf was individually sampled from rank 3 to 12 at four stages (only ranks 3, 6 and 9 are shown). B: Leaf status during each stage was described by physiological and environmental parameters: photosynthetically active radiation (PAR), leaf area, chlorophyll contents, maximum quantum efficiency of photosystems II, water content, total carbon and nitrogen percentages and ratio as well as protein content at harvest time. C: Transcript content of two gene family markers of leaf senescence: chlorophyll a/b binding protein (*CAB*) and Senescence-Associated Genes (*SAG12*). D: Contents of main hormonal compounds already described as regulators of leaf development. The means of three biological replicates with the 95 % confidence intervals are shown. For each stage, statistical differences between leaves are shown by different letters (Wilcoxon test with p -value < 0.05).

positions at the plant axis, taking care of the micro-environment that drives leaf development depending on its phyllochrone. A full polar-metabolome dataset could be obtained allowing clear metabolic pattern distinction and metabolic shifts between physiological sequences of leaf life and providing comprehensive cues of network reconfiguration and pathway orientation that may sustain nutrient resorption.

2.2. Results

2.2.1. Physiological variations during leaf development

Before appreciating the leaf metabolic status during the vegetative lifespan, the first step was to collect material with a progressive gradient revealing the main physiological stages of leaf growth and development. In this respect, *B. napus* plants were sampled at 4 stages during a three-month vegetative growth period under strictly controlled conditions (figure I-1A) with no interactive shading between the plants. At each stage, leaves were harvested individually from rank 3 to 12 (from the oldest to the youngest leaf respectively ; the two first nodal ranks fell prematurely), allowing the instruction of two developmental axes, the first one being considered as vertical (i.e. leaf nodal position on the plant axis) and the second one considered as horizontal (i.e. sampling stage for each identified nodal rank). Photosynthetically active radiations (PAR) have been measured for each leaf rank before sampling as a relevant indicator of incident energy and a certain determinant environmental cue of leaf ontogenesis. As expected a progressive decrease of PAR was observed as the canopy cover density increased (figure I-1B). Conventional growth and nutritional-related indexes have been registered as milestones (figure I-1B and figure I-1C). Based on that information, three main phases of leaf development were highlighted: i) the expansion phase (juvenile stage) was characterized by a rapid leaf area expansion and dried mass production, a slow increase in chlorophyll content and a high nitrogen content (6.5 ± 1 %) with low C/N (example, leaf 9 between stages 1 and 2 on figure I-1B), ii) the maturity phase (mature stage) was characterized by steady leaf area, chlorophyll content and PSII efficiency but lower N proportions and a slowly increasing C/N ratio (example, leaf 6 between stages 2 and 3 on figure I-1B) and finally iii) the senescing phase (senescence stage) with chlorophyll content, PSII potential and N proportions decreasing drastically (example, leaf 3 between stages 3 and 4 on figure I-1B). Total N and soluble protein content evolution during leaf ageing (considering both vertical and horizontal development) highlighted N remobilization activity. Water content as expressed on a fresh weight basis remained high and stable during leaf ontogenesis (figure I-1B) but to the

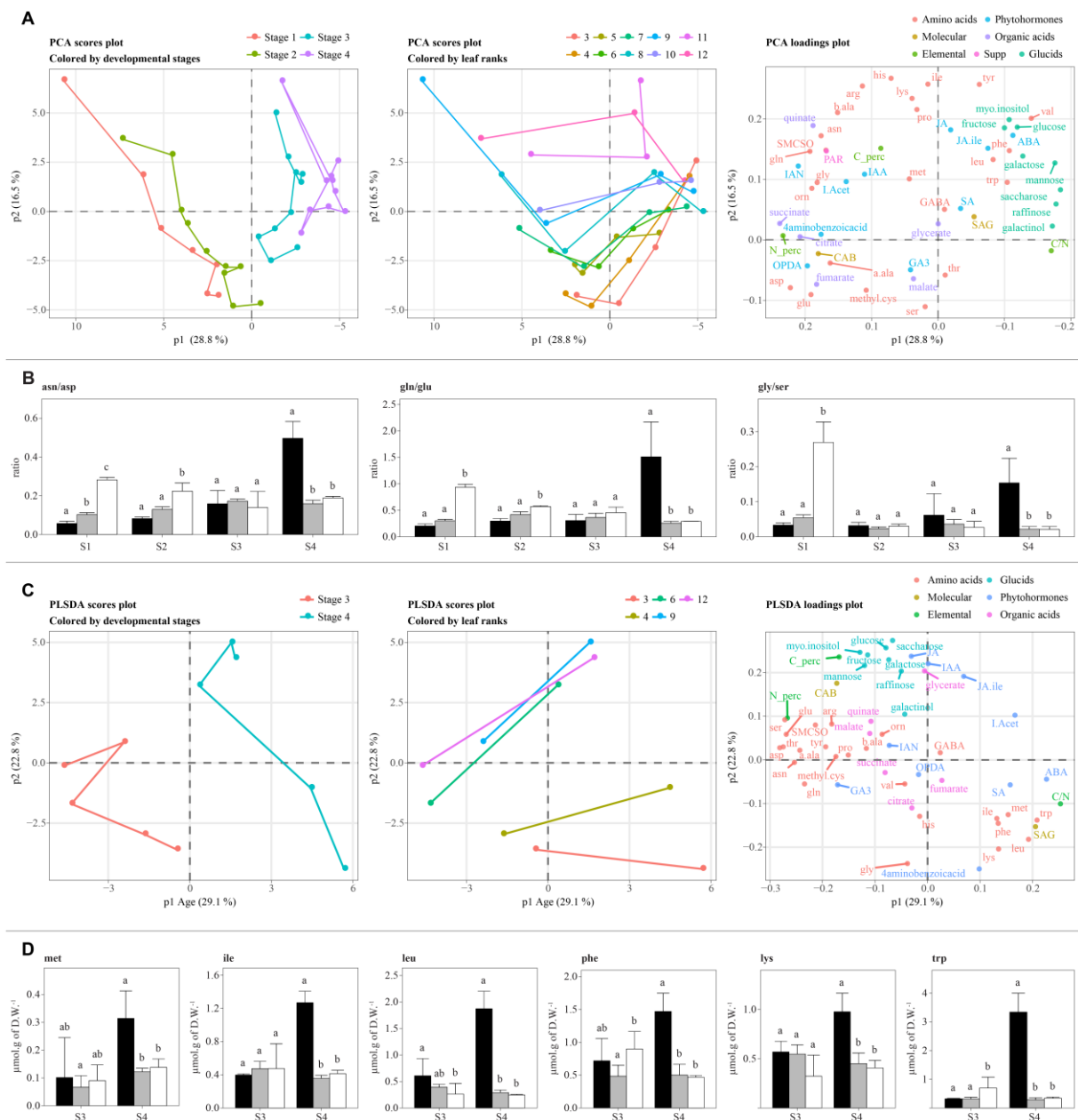


Figure I-2: Multivariate analysis of metabolic profiles of oilseed rape leaf development based on quantitative determinations of total C, total N, free amino acids, soluble carbohydrates, organic acids and phytohormones. **A:** Scores plots (A1 and A2) and loadings plot (A3) from principal component analysis illustrating sampling dates (A1) and leaf ranks (A2). **B:** Ratios of two nitrogen mobile forms interconversion (asn/asp and gln/glu) and of photorespiration markers (gly/ser). **C:** Scores plots (C1 and C2) and loadings plot (C3) from partial least square discriminant analysis (PLS-DA) illustrating sampling dates (C1) and leaf ranks (C2). Sampling dates, leaf ranks and biochemical families are labelled by different colors. The leaves are numbered from 3 to 12 from the oldest to the youngest, respectively. **D:** Absolute contents of key compounds distinctly more concentrated in senescing leaves. The means of three biological replicates with the 95 % confidence intervals are shown. For each sampling date, statistical differences between leaves are shown by different letters (Wilcoxon test with p -value < 0.05). For abbreviations of metabolites see supplementary table I.

extent that dry mass decreased during the progression of senescence, the aged tissues appeared clearly more hydrated. Transcript levels measured for already well described developmental-related gene markers (Guo *et al.*, 2004) clearly confirmed the developmental status of sampled tissues where the chlorophyll a/b binding protein gene (*CAB*) was highly expressed in young leaves and decreased during maturity and ageing and the senescence-associated gene *SAG12* expression was only detected in late stages of ageing (figure I-1C).

Leaf ontogenetic stages have also been characterized by their phytohormone profiles (figure I-1D) which are largely known as intrinsic control factors of leaf development (Fletcher and Adedipe, 1972; Jibrán *et al.*, 2013). As expected, the auxinic substance indole-3-acetic acid (IAA) content strongly declined during development and ageing. More surprisingly, jasmonic acid (JA) content diminished after the expanding phase and was mostly detected in upper young developing leaves as was the active form JA-Isoleucine (JA-Ile). Salicylic acid (SA) content was retrieved in both very young and very old leaves while abscisic acid (ABA) was mostly and specifically accumulated in very old leaves. Each developmental sequence from juvenile to senescing tissues were thus described by very typical phytohormonal patterns (figure I-1D). Thus very young stages were described by high levels of IAA and SA, then when expanding IAA and SA decreased and JA and JA-Ile increased. At maturity hormonal levels remained quite low and when senescence occurred and progressed ABA and SA were specifically increased.

2.2.2. Central metabolism reconfiguration during leaf development and senescence and according to nodal position

To determine how oilseed rape leaf primary metabolism operates during leaf development, targeted quantitative determination of free amino acid, carbohydrate and organic acid content was achieved thus focussing on major contributors to central N and C metabolism. Data were mined together with phytohormone determination to address putative co-regulation processes according to metabolic changes. Principal component analysis was used to show global metabolic adjustments in leaves according to either their maturation stage or their nodal position (figure I-2A). Whole plant and individual leaf ageing was distinctively described by the first component and metabolic signature moved from the left to the right side of the plan according to a developmental progression translating the horizontal timing of development. The second component described leaf

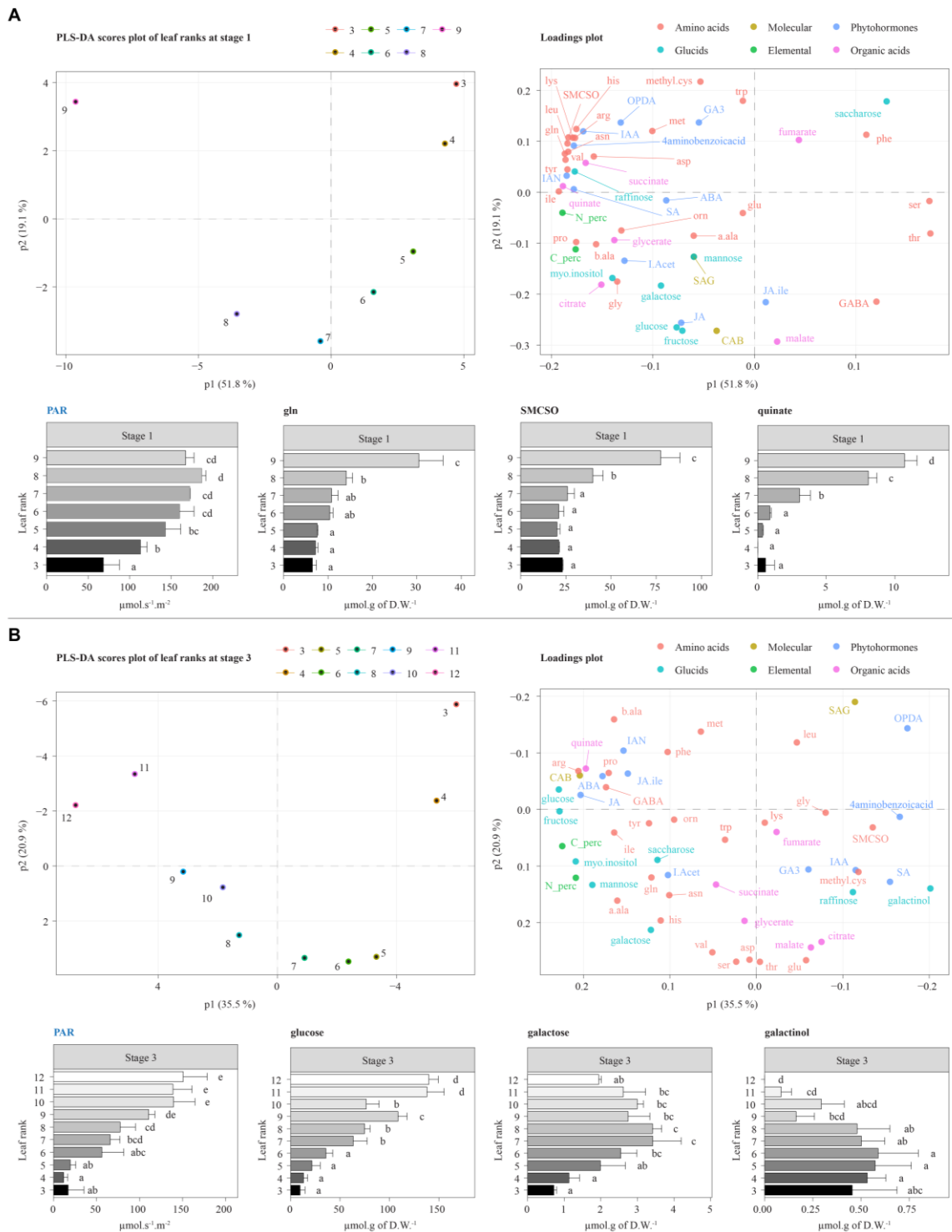


Figure I-3: Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) with corresponding scores plots (A1 and B1) and loadings plots (A2 and B2) from metabolite profiles of the different leaf ranks collected at stage 1 (A) and stage 3 (B). For each stage, photosynthetically active radiations levels (PAR) along with some key discriminant compounds are shown as the means of three biological replicates with the 95 % confidence intervals (A3 and B3). Statistical differences between leaves are shown by different letters (Wilcoxon test with p -value < 0.05). For details see figure 2.

position metabolic profiles and the fingerprint of vertical timing of leaf development depending on the phyllotaxis (figure I-2A). Thus, at first glance, the youngest leaves were characterised by higher typical amino acid (gln, asn, SMCSO, arg and gly), auxin and homologs (IAA, I.Acet and IAN) and selected organic acid (quinate, succinate and citrate) content, while decreasing rapidly during maturity and senescence (figure I-2A). Then in older stages the primary metabolism was shown to be redirected towards the accumulation of carbohydrates (hexoses, di- and tri-saccharides), of glycerate and malate, some other amino acids (tyr, val and GABA, ser, thr) together with an increase in asn/asp ratio. Oldest leaf tissues (age or ranks), described by high ABA and SA levels and a clear induction of *SAG12* gene expression, were characterized by a decrease of most amino acids except compounds with hydrophobic side chains which were shown to be concentrated together with an increase of the gln/glu ratio. Soluble carbohydrate levels dropped in senescing tissues while the C/N ratio was shown to increase (figure I-2A). To describe more precisely the variations occurring during late development and probable highly active nutrient recycling processes, partial least square discriminant analysis has been performed on the latest dates of sampling (stages 3 and 4) from corresponding old, mature and young leaves (figure I-2C). Since metabolic deviation became apparent between the two stages of development at the whole plant level highly robust metabolic signatures were highlighted for senescing tissues as compared to younger ones (figure I-2C). Thereby the upper-left corner of the plots regrouped mature and young leaves whereas the bottom-right area pictured senescing leaves characterized by high ABA and SA levels, high *SAG12* transcript abundance and described by specific metabolite accumulation, namely met, ile, phe, leu, lys and trp with increasing ratios of asn/asp, gln/glu and C/N (figure I-2B, figure I-2C and figure I-2D).

Marked metabolic restructuring was thus observed during leaf development, although leaf position on the plant axis should have influenced ontogenesis processes and may have driven to distinctive signatures of metabolism adjustments. Thus, using discriminant analysis, individual metabolic profiles could be assigned to each leaf depending on its position and according to the sampling date (figure I-3). As already mentioned, a PAR gradient was clearly measured all along the plant axis, basal older leaves being far less illuminated (down to between 40 % and 10 % of maximum depending on the developmental stage) than younger apical leaves (figure I-3). During early plant development (sampling date 1), the younger leaf (rank 9) at the top of the canopy, metabolically very distinct with higher concentrations of many amino acids (i.e. gln, asn,

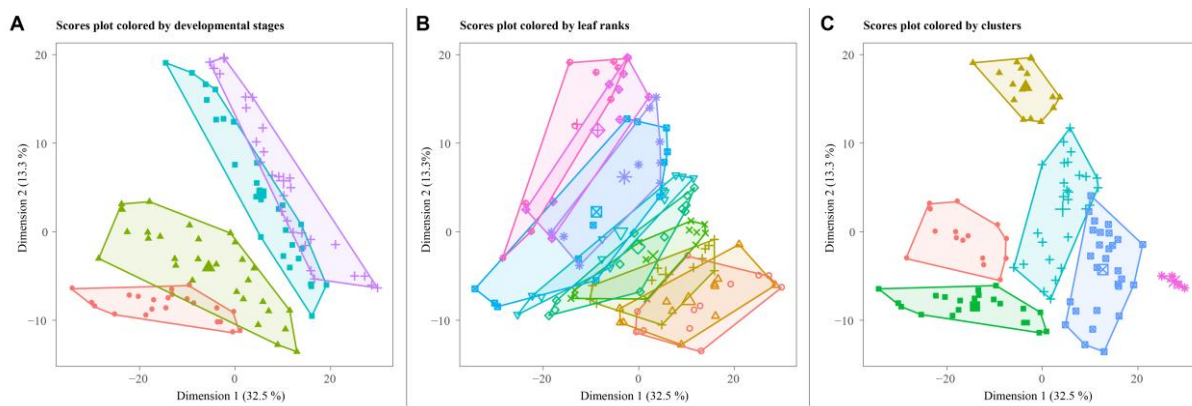


Figure I-4: Principal component analysis of metabolomic profiles based on 512 untargeted mass tags and 48 targeted compounds from different leaf ranks (leaf 3 to leaf 12) collected at 4 sampling dates (stage 1 to stage 4). Individuals are shown on the scores plot and colored either by their developmental stage (A), their rank along the plant axis (B) or by their grouping clusters (C) using the k-means method.

leu, lys, tyr, val his, arg, ile, meth and SMCSO) as well as specific forms of carbohydrates (i.e. raffinose, myo-inositol and mannose) and organic acids (mostly quinate and to some extent succinate and glycerate) (figure I-3A). At that developmental stage, young leaves were also characterized by low C/N and high asn/asp and gln/glu ratios. Older bottom leaves were defined by an overall fall of metabolites except ser, phe, thr and sucrose whose levels remained high (figure I-3A). Then at later stages of plant growth and development (sampling date 3 on figure I-3B), new leaves appeared, and three metabolic groups could be described corresponding to i) the top/youngest leaves (e.g. ranks 11 and 12), enriched in glucose and fructose and some amino acids (i.e. pro, arg, GABA, asp, tyr, orn and ile) and quinate, ii) the middle/mature leaves (from ranks 5 to 10) described by higher levels of some carbohydrates (namely raffinose, galactose and galactinol), amino acids (i.e. asn, his, val, ser, asp, thr and glu) and most measured organic acids (i.e. succinate, glycerate, malate and citrate), and iii) oldest leaves at the bottom (ranks 3 and 4) with very low PAR (lower than 10 % of maximum) and *SAG12* gene induction and increased concentrations of senescence-associated compounds (leu, OPDA, C/N) along with overall reduction of other soluble metabolites (figure I-3B).

2.2.3. Metabolomic overview of leaf development to get insights into physiological status transition and metabolic network reorganization

To obtain a broader and refined view of the metabolic history that punctuates leaf development, along the plant axis, non-targeted metabolite profiling by ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) coupled to high resolution mass spectrometry (HRMS) has been performed from the polar fraction of leaf extracts. The objective was to identify the main physiological stages that characterize the life of the leaf and to identify the main metabolic networks and markers likely to feed the early processes of cell proliferation and elongation, the source/sink transition steps and the remobilization processes related to senescence. Using XCMS software and the Galaxy workflow for metabolomics, 2 329 mass tags were detected (1 161 in positive and 1 168 in negative modes). After normalization, only the ions with less than 30 % of variations in QCs (Quality Controls) were kept. Thus 2 095 mass tags were clustered and annotated using CAMERA software. Only clusters with the protonated molecular ion and at least its first isotopic peak were used. Then isotopes, adducts and neutral losses were discarded, leaving 512 mass tags usable for further analysis. To enrich information and guide putative annotation of anonymous ions data delivered from the targeted profiling

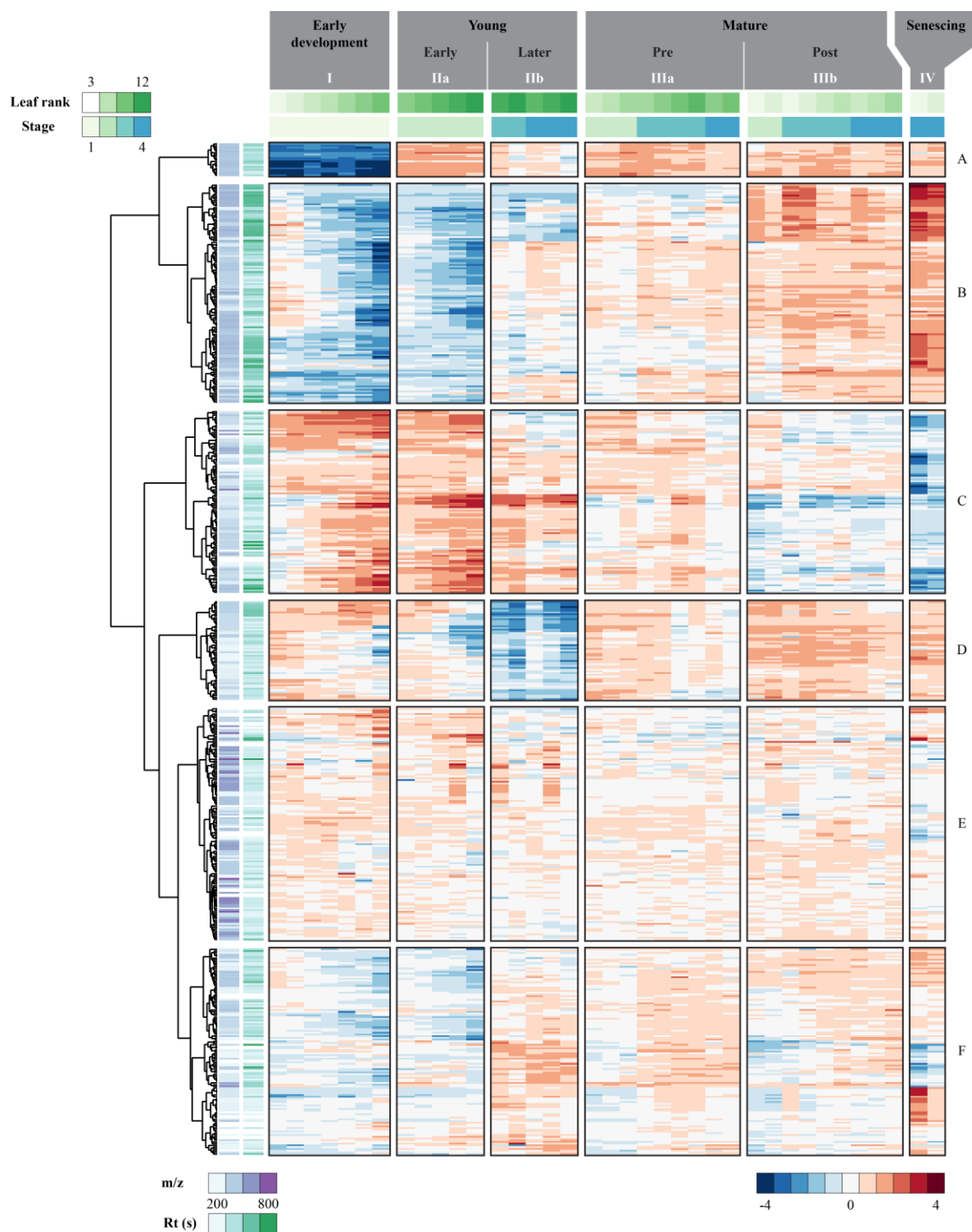


Figure I-5: Hierarchical clustering of metabolomic profiles based on 512 untargeted mass tags and 48 targeted compounds from different leaf ranks collected at 4 sampling dates (means of three biological replicates). The clustering was done using the hierarchical k-means method on transformed (glog) and scaled (Pareto) data. Samples (horizontal) are grouped and sub-clustered into 6 clusters (I to IV) named by their supposed match to putative developmental status. Leaf ranks and developmental stages are shown above the heatmap. Metabolites (vertical) are clustered into 6 groups (A to F) depending on their distribution across the samples. For untargeted data, retention time (rt) in seconds and m/z are illustrated through a false color scaling).

experiments (see above) were added thus leading to a global data set of 562 analytes available for the discriminant treatment. As shown by the principal component analysis (figure I-4), the data structure was preserved, with gradual organization of metabolic patterns differentiating sampling dates and developmental stages or leaf ranks. To achieve a better understanding of unsupervised metabolic profile distribution, clustering operations have been addressed leading to the definition of six perfectly differentiated metabolic clusters (figure I-4C). A double clustering representation was then carried out in order to hierarchize relevant metabolites/analytes in each pre-defined individual cluster (figure I-5). Samples were thereby grouped in four main clusters: the first one (cluster I figure I-4C and figure I-5) contained most samples from the first sampling date and was attributed to “early development”, the second one (cluster II figure I-4C and figure I-5) was exclusively described by the youngest leaves and could be subdivided in “early” (IIa) and “later” (IIb) for young leaves collected from respectively the second (IIa) and the third and fourth stages (IIb). The third cluster (cluster III figure I-4C and figure I-5) gathered strictly mature leaves from all collecting dates and was subdivided in “pre-mature” (IIIa) which were closer to young leaves and post-mature (IIIb) which were closer to senescing leaves, mainly grouped in the fourth cluster (cluster IV figure I-4C and figure I-5). Moreover, on the heat map, analytes/metabolites were organized into six main groups depending on their convergent pattern (figure I-4C and figure I-5 clusters A to F). Compounds in cluster A remained specifically low during early development, whereas compounds found in cluster B were also low in early-young leaves and gradually increased during leaf development to be maximal in senescing leaves. Conversely, compounds clustered in the C group were higher in early development and young leaves and gradually decreased to minimal levels in senescing leaves. By contrast to cluster F, compounds of cluster D remained specifically low in “later-young leaves”. Compounds indexed in the group E could not be clearly assigned to sample’s identity and showed more random signatures. Supervised statistical analysis of these clusters have been made using OPLS-DA (supp. figure 1) and the most discriminant metabolites were tested using a Wilcoxon test with *fdr* correction. Between the four main developmentally-related clusters: early development, young, mature and senescing leaves, 514 analytes were considered significantly different in at least one combination (figure I-6), 165 were common to all groups, 61 were revealed to be specific of the transition from young to mature stages, and 29 distinguished mature to senescing leaves. Leaf tissues associated with the “early development” phase were specifically categorized by 57 analytes.

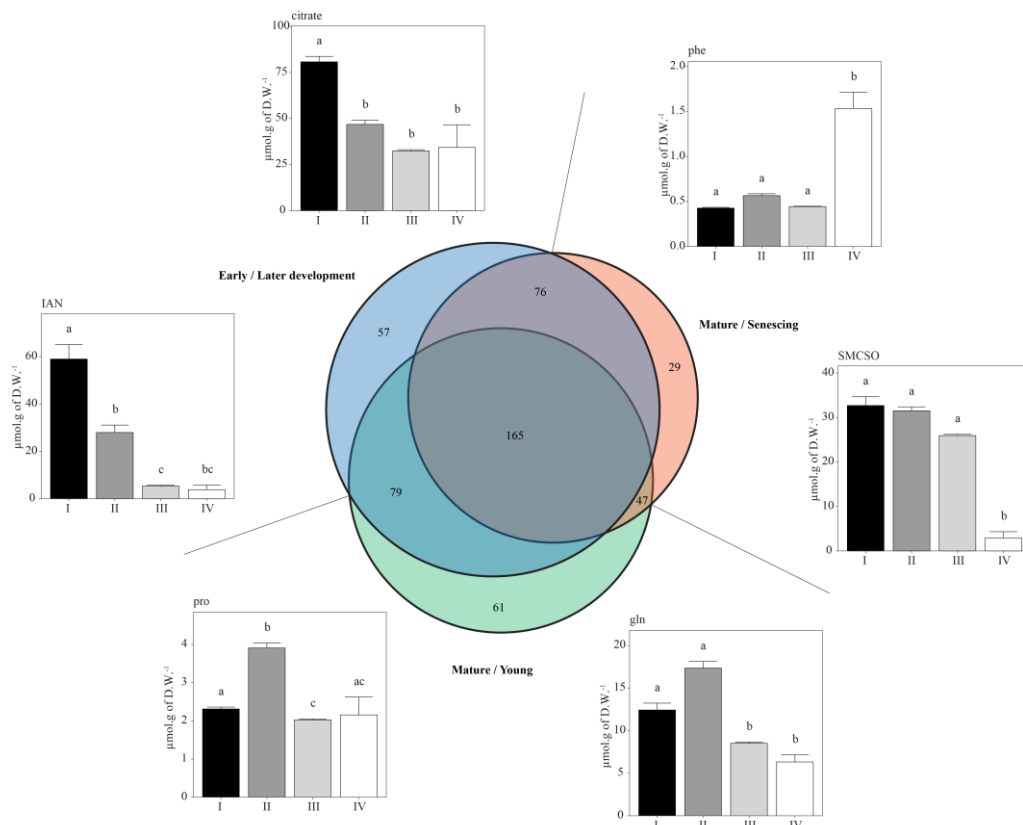


Figure I-6: Venn diagram referencing analyte numbers supporting OPLS-DA models of discrimination between stages of leaf development from early development (I), young (II), mature (III) to senescing tissues (IV) (see figure 4 and figure 5). Only the analyte levels with p -value < 0.5 were used (computed with Wilcoxon test and fdr correction). For each situation, histograms illustrate distinctive identified markers.

The next step was to annotate and identify the largest number of analytes representative of the different metabolic steps connected to leaf development stages along the plant axis in order to suggest physiological meanings to these metabolic states. Annotations were performed on MS1 exact masses by screening databases with a 5 ppm tolerance. Because online databases are not exhaustive and despite the high resolution of mass measurements, all mass tags couldn't be annotated and multiple annotations could be proposed for the same mass. To avoid any confusion, these were tentatively discarded despite putative obvious interest as biomarkers. With the exception of the compounds measured by targeted assay whose identity was confirmed by co-analysis of the pure reference compound, the annotations attributed by the non-targeted analysis were not confirmed by confrontation with commercial molecules. Only the results concerning compounds with strong annotation scores were thus replaced on a refined metabolic map (figure I-7). To illustrate metabolite quantitative variations between clusters, their levels were log transformed and scaled. Thus metabolic signatures of leaves corresponding to "early stage of plant development" (cluster I) were very similar to what has been considered to "early-young" leaves (cluster IIa) with some differences. Both are characterized by high levels of active growth-related phytohormones (namely auxins and OPDA), low carbohydrate content, high organic acid levels and high levels of some secondary metabolites from glucosinolate (e.g. glucobrassicin, indoymethylthiohydroximate and indoymethyl-desulfoglucosinolate) and phenolic pathways (e.g. scopolin, coumarin and 4-methylumbelliferyl glucoside). However, higher levels of gly, α -Ala and GABA were found in cluster I, whereas trihomomethionine and gluconasturtiin were more typical of cluster IIa. Young leaves from early and later stages (IIa and IIb) shared some similarities, with high levels of β -ala, arg, umbelliferone, gluconapin and glucobrassicinapin. However, young leaves from later stages were more specifically described by higher levels of some carbohydrates (e.g. myo-inositol, mannose, galactose, sucrose, fructose and glucose), some phytohormone-related compounds (JA), amino acids (pro) and lower contents of organic acids. Then there was a clear metabolic transition between young and mature leaf profiles. For instance, pre- and post-mature leaves (cluster IIa and b) were chemotyped by increasing levels of galactinol and raffinose and decreasing levels of all other carbohydrates as well as an overall decrease of glucosinolate levels in contrast to some monolignols (e.g. sinapaldehyde and 5-hydroxyconiferaldehyde), one stilben (acanthoside B) and one lignan (phrymaraolin I). Finally, senescing leaf (cluster IV) profiles are much more deeply altered, with increasing levels of stress related phytohormones (SA and ABA), some amino acids (i.e. branched-chain

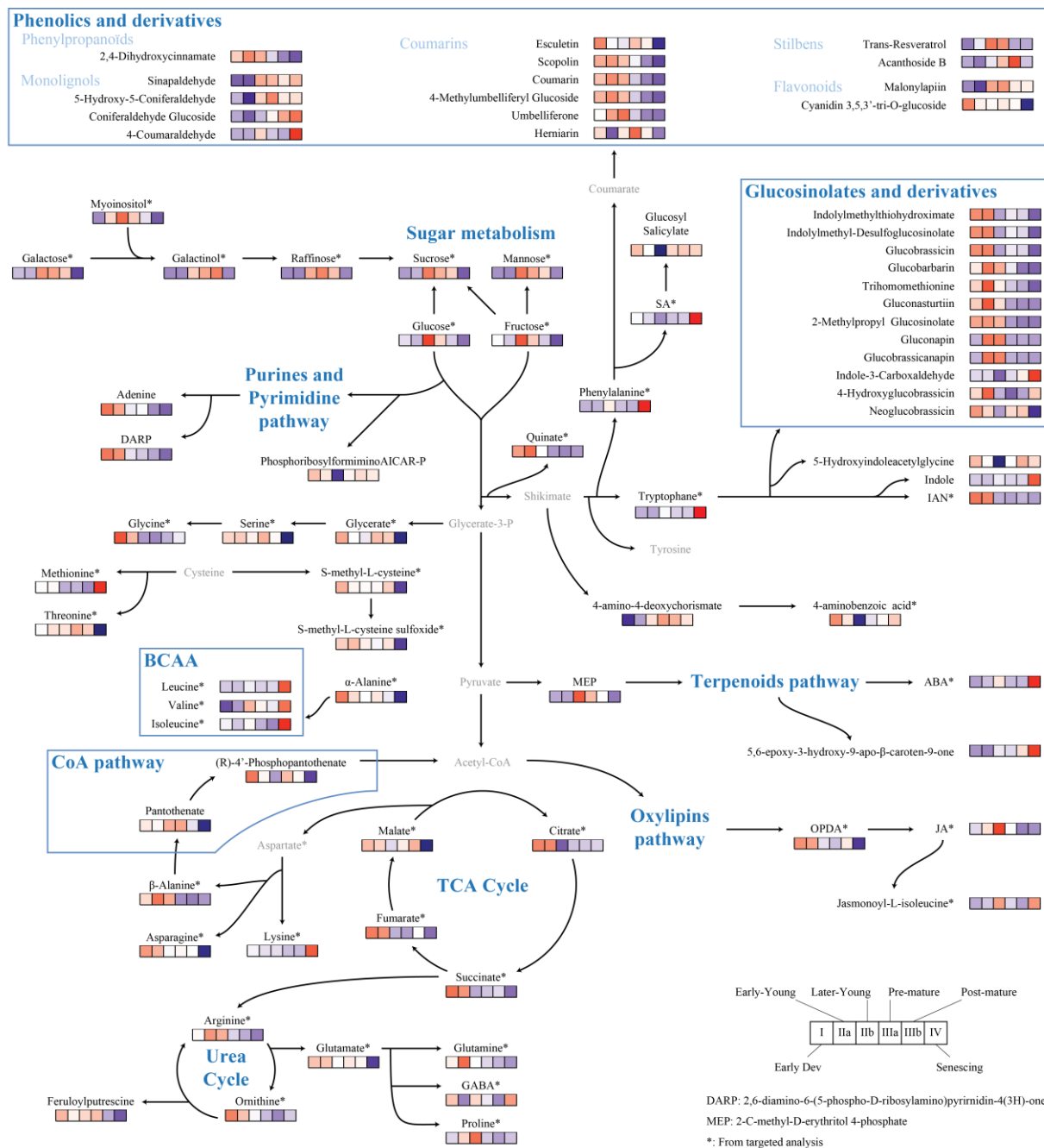


Figure I-7: Metabolic map illustrating biomarker metabolite changes in oilseed rape leaves during ageing. The metabolite levels are represented according to the six pre-defined clusters of samples (see figure 5 and figure 6). Metabolite levels are presented in shades of blue and red as transformed (glog) and centered data according to the scale bar. Metabolites levels measured by targeted analysis are marked with an asterisk, the others are from untargeted analysis (LC-HRMS) and annotated from their m/z through the Plant Metabolic Network database (PMN).

amino acids, aromatic amino acids, met and lys) and a monolignol (4-coumaraldehyde). Conversely, lower OPDA and carbohydrate contents were observed as well as lower levels of some amino acids (i.e. ser, thr, α -ala, arg, asp, gln and glu) and malate.

2.3. Discussion

Crop biomass production and yield determination should be placed in the context of morphogenesis patterning and whole plant source-sink interrelationships driven by metabolic supply and demand and conditioned by genotype x environment x crop management influences (Rossi *et al.*, 2015). Optimization (both genetically and environmentally) of metabolic pathway fluxes, metabolite partitioning and allocation and correctly timed and located reserve deposition should indubitably improve plant performances. Resource distribution both determines and is dependent on developmental stage and the reproductive strategy of the considered species (Rossi *et al.*, 2015). Cessation of vegetative growth followed by flowering and fruiting is known to induce major changes in plant metabolism and nutrient resorption and partitioning (Guiboileau *et al.*, 2010). Leaves are responsible for most of the fixed and re-allocated carbon in a plant and are critical to plant productivity and survival. An understanding of the metabolic processes underlying leaf development thus provides an insight into the intrinsic production potential the modulation of which may significantly influence strategies to improve crop performance (Fleming, 2005). Leaf phenology, or the organization of leaves in time, should also be considered in relation to leaf arrangement in space. Leaf development encompasses different stages. Initially, young leaves undergo rapid expansion by absorbing nutrients and synthesizing proteins to achieve efficient photosynthesis and then, they enter into stages of maturation and senescence. Leaf senescence is not merely a process during which cell function deteriorates. It also facilitates the mobilization of nutrients from senescing leaves to young tissues and reproductive organs (Li *et al.*, 2016). Moreover, leaf sequential senescence is not imperatively related to flowering and can be observed during the vegetative stage (Wingler *et al.*, 2010). Thus, as a determinant process in plant growth and for nutrient remobilization in plants, leaf development and more specifically leaf senescence, is largely studied in different model (Watanabe *et al.*, 2013) and crop species (Clément *et al.*, 2018). Multiple regulatory and functional scales of senescence-directed events have been studied, i.e. genomic, transcriptomic, proteomic and metabolomic with more recently an emphasis on inter-organelle studies (Woo *et al.*, 2016). Thus, during its lifespan, it has been widely accepted that leaves goes through different

phases which can be classified in three main stages: growth, maturity and senescence, ultimately leading to the death and fall of the leaves. But the number, the timing and the transition between those different phases are not clearly described partly because of the high variability between species, but mostly because numerous endogenous and exogenous factors are regulating the onset and timing of this ageing evolution (Woo *et al.*, 2013; Zhang and Zhou, 2013). Moreover, the physiological or molecular markers used to describe these phases will determine the number of observable transitions. Thus, the overall plant resources and the individual leaf micro-environment may lead to confounding effects regarding developmental sequences. This is of special importance when using the differences between leaves at a unique developmental stage as an ageing model (Masclaux *et al.*, 2000; Bresson *et al.*, 2017; Clément *et al.*, 2018). In this work we design a metabolic typology of developmental stage progression of leaves in oilseed rape, based on the combination of targeted and non-targeted metabolomic profiling. By using the individual position of leaves at 4 growing stages and unsupervised classification, we combined two developmental dimensions in order to dissect more precisely the metabolic networks that govern the individual ageing integrated into the micro-environment and the trophic exchanges that specifically describe each organ.

2.3.1. Phytohormonal regulation of leaf development

Phytohormones are known to orchestrate the global plant development through the coordination of individual organ ontogenesis and by integrating environmental signals and triggering adapted molecular processes (Bishopp *et al.*, 2006). Confirmed here as an early growth regulator, the IAA auxinic substance is concentrated in young oilseed rape leaves, and one of its precursors, IAN, is only detected at early stages of leaf development. This is consistent with the observations reporting that auxin biosynthesis pathways are repressed during ageing and senescence in *A. thaliana* (Lim *et al.*, 2010; Schippers, 2015). In the same way, OPDA, a precursor of JA is mostly present during very early development whereas JA and JA-Ile are concentrated in expanding young leaves. It has been reported that JA biosynthesis-related genes are activated early during leaf development although an increase of JA levels was detected during senescence in *Arabidopsis* (Jibrán *et al.*, 2013). In oilseed rape, JA and JA-Ile may be recruited earlier since their contribution may be associated with the transition from young to mature leaf tissues and could participate to regulate the metabolic transition from sink to source status together with auxins. Later on, during leaf ageing and senescence progression assisted by the decrease of JA related-compound levels, SA and ABA concentrations

increase drastically. It has already been shown that SA is closely related to nutrient recycling events by regulating autophagic processes (Guiboileau *et al.*, 2010) whereas ABA accumulation is symptomatic of late senescence stages (Jibrán *et al.*, 2013). In *Arabidopsis*, ABA signaling and biosynthesis pathways activated during leaf senescence have been described to be coupled to changes in metabolic fluxes and sugar-related regulating processes (Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Recently, a rice NAC transcription factor has been shown to promote leaf senescence via ABA biosynthesis (Mao *et al.*, 2017). In oilseed rape both SA and ABA elevated levels can be viewed as typical markers of late senescence, although their regulating roles deserve more attention. Other hormonal compounds, not addressed here, should surely accompany regulation of metabolic network adjustments related to leaf ontogenesis as already mentioned in other species for cytokinins, gibberellins, ethylene or brassinosteroids (Jibrán *et al.*, 2013).

2.3.2. Metabolic design of early plant development and young leaf expansion

At early stages of whole plant development, with scarce endogenous and autotrophic resources, the plant needs to rapidly produce biomass to sustain subsequent growth processes. Consequently, the first appearing and expanding leaves should develop quickly with a short lifespan. Although the overall metabolite fingerprint of leaf tissues collected at the youngest stage of plant growth strongly resembles those of typical young developing tissues, specific metabolic cues could be recognized from this early developmental stage (figure I-5). For instance, most detected organic acids are highly concentrated during early development. Similar profiles have been reported in tobacco leaves (Li *et al.*, 2017), consistent with the needs to produce energy and substrates for rapidly growing organs. Conversely, these early stages of leaf development are characterised by low levels of carbohydrates, showing a high turn-over where photosynthetic carbon resources are most certainly used to promote growth. Orn, Arg, Glu, Gln, Pro and GABA amino acid metabolisms represent the main platform for nitrogen and carbon assimilation and partitioning (Majumdar *et al.*, 2016). All of these compounds are fairly well represented at early stages with some specificities: Glu is mostly present in young leaves at early stages, and Pro/Orn have complementary profiles, with Pro/Orn ratios increasing from very early development to young leaf stages. An increasing body of evidence indicates that proline, besides its well-described roles in cell adaptation to osmotic stress, is also involved in many processes of plant development, as a signal molecule (Lehmann *et al.*, 2010;

Szabados and Savouré, 2010) and to fuel high energy-consuming metabolic and osmotic-driven elongation processes like meristem development and leaf expansion (Biancucci *et al.*, 2015; Chrobok *et al.*, 2016). Similarly, inside secondary metabolism, coumarin and glucosinolate related compounds are abundant at early stages and in young leaves, consistent with observations in *A. thaliana* (Brown *et al.*, 2003) and *B. nigra* (Merritt, 1996) with defensive roles against predators or S storage.

2.3.3. Metabolome reconfiguration during sink to source transition

An important physiological transition during leaf development is between young developing tissues, recognized as nutrient importers or sink, and mature tissues described as nutrient exporters or source, although both processes should operate within the same leaf. In order to reach a balanced development, source tissues need to produce and reallocate the metabolic resources needed in sink tissue through the vascular system. Since the timing of this transition will impact the overall architecture and growth performance, it is under strict regulation by multiple factors: as the sink “strength” or endogenous and exogenous resources available (Lemoine *et al.*, 2013). The onset of this transition may be initiated well before the leaf is fully extended. For instance, it has been reported in sugar beet that regarding carbohydrates, it happens when leaves reach 35 to 45 % of their final length (Fellows and Geiger, 1974). For nutrient management, the sink/source transition is expected to follow considerably localized metabolic reconfiguration to sustain leaf development proceeding as well as production of recyclable C, N and S nutrients. Some of these metabolite vectors play a key role in regulating resource partitioning and allocation, as shown for sugars (Lastdrager *et al.*, 2014). Glucose accumulation has been reported to help the transition from juvenile to adult organs, which is consistent with the profiles observed here in oilseed rape leaves. Indeed, young leaves were accumulating, not only glucose, but other hexoses and sucrose as well, which then decreased gradually in pre- and post-mature stages. Similar patterns have been observed in *Arabidopsis* single leaf development (Watanabe *et al.*, 2013), therefore hexose and sucrose involvement during sink to source transition should be further investigated as they seem to be conserved markers for this physiological transition.

As much as the carbohydrate compounds play a key role in resource partitioning and allocation, nitrogen assimilation and utilization pathways were also impacted, but with different timing. For instance, glu is a key component in nitrogen assimilation and is

rapidly accumulated in young leaves and maintained during ageing, whereas gln and asn, which are generally described as mobile forms of assimilated nitrogen, decreased gradually during the transition and during leaf maturation. Interestingly, gln/glu and asn/asp ratios, proposed as accurate indicators of interconversion and of nitrogen transport (Watanabe *et al.*, 2013; Clément *et al.*, 2018), are higher in young leaves during early development than in mature leaves because of higher gln content, possibly due to high intake of gln and asn from older tissues or local production to build proteins. Other central precursors are also increased just before the transition from sink to source, like β -alanine and OPDA as precursors of respectively acetyl-CoA and JA, possibly to give the necessary substrate needed, since JA levels are high during the pre-mature phase as OPDA decreases.

Beside recycling of primary precursors, ageing is associated with increasing oxidative damage often concerning secondary and specialized metabolism. In the field of antioxidant compounds, pigments play an important role in cell protection against light-driven oxidation processes. During leaf pre-mature stages, MEP, precursor of the chloroplastic terpenoid pathway, is accumulated and decreases gradually during leaf maturation. The MEP pathway is highly solicited for a vast variety of compounds directed for instance to oxidative protection via carotenoid biosynthesis (Biswal, 1995; Munné-Bosch and Alegre, 2002; Cazzonelli and Pogson, 2010) or to developmental regulation (ABA and GA). Interestingly an epoxy-carotenoid is present in the polar fraction and increases during ageing as MEP decreases gradually. This compound is a product of violaxanthin oxidation and its accumulation may be linked to increased oxidative damage or a defect in salvaging systems (Biswal, 1995).

During the mature phase, leaves continue their growth; as such, metabolic modification strengthens their structures. In this context it is not surprising that metabolites dedicated to cell structures can be identified during this final period of expansion. Monolignols are lignin precursors and are spotted in our study during the pre- but mostly during the post-mature phase, which is concomitant with the end of leaf expansion and the need to produce more stable and resistant mechanical structures.

Immature tissues, probably lacking phenological and mechanical barriers, are shown here to be enriched in secondary metabolites, like glucosinolates and coumarins, supposedly associated with chemical defence. Their role in protection against predators is well documented, with possibly less well understood functions in development regulation, as

antioxidant firewall or nitrogen assimilation control (Bourgaud *et al.*, 2006; Grubb and Abel, 2006; He *et al.*, 2014). Most detected coumarins and glucosinolates are present in young leaves and decrease drastically during maturation. These metabolic declines can also be associated with controlled remobilization processes. In particular for glucosinolates, where clear fluctuations observed during the sink to source transition may confirm their potential role as a transportable form of S as already demonstrated (Chen *et al.*, 2001; Bekaert *et al.*, 2012; Jørgensen *et al.*, 2015).

2.3.4. Metabolic signatures of leaf senescence

At the end of maturation, leaves engage in a process of quick degeneration resulting in tissue yellowing, autophagic-driven metabolic drain until the leaves fall as generally observed in oilseed rape. At this stage, the underlying processes of structural break down, reserve utilization and nutrient remobilization initiated during the mature phase is amplified as the cells shift to programmed death reconfiguration (Lim *et al.*, 2007). Although appearing disordered and chaotic these processes are in fact highly regulated (Breeze *et al.*, 2011; Woo *et al.*, 2016) and ABA and SA peaks pointed out here could be associated with these signalling and regulation networks. As such, most compounds associated with central metabolism and energy production start to decrease. Soluble carbohydrates levels drop in senescing tissues while C/N ratio increases. In fact, the overall nitrogen levels decrease drastically during this stage and demonstrate the trophic urgency of prioritizing nitrogen recycling. As such, most amino acids are depleted (ser, α -ala, asn, glu, thr) for interconversion to mobile forms (gln, asn, SMCSO) or for energy production (GABA, β -ala) and as a result, gln/glu, asn/asp and ser/gly ratios increase. In contrast, some amino acids are accumulating (BCAAs, phe, meth, trp, lys) which can be explained by downstream pathway locking and penalties to translocate or to convert to mobile forms. Since energy salvaging processes are known to be highly controlled during senescence (Avila-Ospina *et al.*, 2014; Poret *et al.*, 2016), the breakdown products of branched chain and aromatic amino acids can provide electrons to the electron transport chain via the ETF complex or feed indirectly into the tricarboxylic acid cycle (Araújo *et al.*, 2011). It can be assumed that senescence may induce symptoms of carbohydrate limitation for local utilization and protein degradation could provide an alternative source of electrons to the mitochondrial electron transport chain (Araújo *et al.*, 2011). Glucosinolate depletion is clearly assigned in our study to the chemotype of senescing leaf tissues and as a putative commitment in S salvage and remobilization. Other putative degradation-related compounds are also specifically detected during leaf senescence like

indole residue, epoxy-carotenoid derivative, 4-coumaraldehyde or indole-3-carboxaldehyde which highlight open questions about secondary metabolism turnover and contribution to nutrient recycling.

2.3.5. Micro-environmental regulation of leaf development and metabolite fingerprint

Leaf resource production is closely related to photosynthetic performance. As such, light quantity and quality and inherent radiation use efficiency play a central role in leaf development and is a key component in determining the timing and duration of ageing processes (Wingler *et al.*, 1998). In that way, phyllotaxis and arrangement of leaves along the plant stem should condition the light environment of the leaf and cause adequate and specific metabolic reactions. Thus, confounding factors will be likely to interfere with the normal metabolic functioning of the developing leaf not only because of a specific light environment but also because each leaf establishes its own typical trophic relationships with neighboring organs. Studies exploiting natural diversity in *Arabidopsis* and contrasted growth conditions related to carbon and nitrogen availability have shown that environmental conditions must be taken into account when searching for individual metabolites or sets of metabolites that act as biomarkers for biomass prediction (Sulpice *et al.*, 2010; Sulpice *et al.*, 2013). As expected a progressive decrease of PAR was observed in our study as the canopy cover density increased. As already stated, marked metabolic restructuring is observed during leaf development, although leaf position on the plant axis has influenced ontogenesis processes and has driven to distinctive signatures of metabolism adjustments.

Our present results provide for the first time refined metabolic networks which punctuate the different phases of leaf development and a set of candidates of effector and/or regulatory metabolites that should be further elaborated to define their roles in trophic functions and nutrient partitioning and allocation.

2.4. Material and methods

2.4.1. Reagents and chemicals

LC-MS grade Metyl-Tert Butyl Ether (MTBE), acetonitrile (ACN), water (H₂O), acetic acid (CH₃COOH) and formic acid (HCOOH) were purchased from Sigma-Aldrich (USA) and methanol (MeOH) was purchased from VWR. The standard mixtures used for the external calibration of the Q Exactive™: Pierce™ LTQ Velos ESI Positive and Pierce™ Negative, were purchased from Thermo Fisher Scientific. The internal standards for non-targeted analysis: leucine-5,5,5-d₃, L-tryptophan-2,3,3-d₃, 2,4,5,6,7-d₅-3-acetic acid and 1,14-tetradecanedioic-d₂₄ acid, and targeted analysis: adonitol and β-Aminobutyric acid (BABA), were purchased from Sigma Aldrich.

2.4.2. Plant growth conditions and sample collection

Oilseed rape plants (*Brassica napus L.* cv. “Aviso”) were grown in a growth chamber at the vegetative stage under 14 h of light per day (200 μmol.photon.s⁻¹.m⁻²) at 22 °C/17 °C (day/night) with 80 % relative humidity. Seeds were directly sown in 4 l pots filled with peat-based medium (Falienor 9226-6F2 , France) and watered twice a week with a complete nutrient solution (N:P:K:Mg, 2.5:5:2.5:0.75 and oligo-elements, Liquoplant bleu®, Courthézon, France). Samples were collected 42, 48, 61 and 67 days after sowing between 09:00 and 10:00 am to limit circadian variation biases. All leaves of three random plants were individually sampled at each date (at the first sampling date, leaves 1 and 2 had fallen and were not sampled). On the previous day, three physiological parameters were recorded: the relative chlorophyll content was estimated using a non-destructive chlorophyll meter (SPAD-502, Konica Minolta, Japan) as an average of 6 independent measurements. The maximum quantum efficiency of Photosystem II (F_v/F_m) was measured using a fluorometer (Handy PEA, Hansatech Instruments, England) as an average of 3 independent measurements. The Photosynthetically Active Radiation (PAR) at the center of the leaf’s surface was measured using a light meter (Li-250A, LI-COR®, USA). On the day of collection, RGB photographs were taken before leaf-petiole cutting. Then the leaf blade was separated from the main vein and quenched in liquid nitrogen. Frozen material was ground into a fine powder with a bead mill for 30 sec at 50 Hz (TissueLyser II, Qiagen, Germany) and stored at -80 °C before analysis.

2.4.3. Sample preparation and extraction

Plant powders were freeze-dried and 10 mg was used for MTBE based extraction adapted from (Krueger *et al.*, 2014). The extraction mixture consisted of MeOH/MTBE (1:3) with internal standards (leucine-5,5,5-d₃, L-tryptophan-2,3,3-d₃, 2,4,5,6,7-d₅-3-acetic acid and 1,14-tetradecanedioic-d₂₄ acid for non-targeted profiling; adonitol and BABA for targeted analysis). Extraction was performed by adding 1 ml of the extraction mixture (-15 °C), shaken for 1 h and followed by a sonication step (15 min at 4 °C). Phases were separated by adding 650 µl of H₂O/MeOH (3:1), vortexing immediately for 1 min and followed by a 5 min centrifugation at 12,000 g. The upper apolar phase was kept for chlorophyll quantitation, the lower polar phase for targeted and non-targeted analysis and the pellet was kept for total soluble protein determination. A fraction of each biological sample was pooled together for Quality Controls (QC).

2.4.4. Targeted profiling of carbohydrates by GC-FID

Non-structural carbohydrates and organic acids were analysed by GC-FID as described by Adams *et al.* (1999) and refined by Lugan *et al.* (2009) with some modifications. Briefly, 50 µl of the polar extract was evaporated with a Speed-Vac concentrator at 30 °C and resuspended in 50 µl of pyridine with methoxyamine (20 mg.ml⁻¹). After 90 min at 30 °C, 50 µl of MSTFA (N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide) was added and incubated at 37 °C for 30 min. After 4 h at room temperature, 1 µl was injected into a Trace 2000 GC-FID (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, CA, USA) fitted out with an AS2000 autosampler (Thermo-Fisher Scientific), a split/splitless injector (split mode set to 1: 25) at 230 °C, a J&W DB5 30 m × 0.32 mm × 0.25 mm column and a flame ionization detector at 250 °C. The temperature gradient was as follows: 5 min at 70 °C, 5 °C.min⁻¹ up to 220 °C, 2 °C.min⁻¹ up to 260 °C, 20 °C.min⁻¹ to 300 °C and finally, 5 min at 300 °C.

2.4.5. Targeted profiling of amino acids by UPLC-UV

Amino acids (AAs) were analysed by UPLC-DAD with Waters kit (Waters Corporation, Milford, MA, USA), according to the method described by Cohen and Michaud, (1993), adapted by Bouchereau *et al.* (1999) and refined by Renault *et al.* (2010; Albert *et al.*, 2012). Briefly, 50 µl of the polar extracts was evaporated with a Speed-Vac concentrator at 30 °C and resuspended in 50 µl of MilliQ water. Then 5 µl was mixed with 35 µl of AccQ•Tag borate buffer and 10 µl of AccQ•Tag reagent solution. The reaction was done at 55 °C during 10 min and transferred in UPLC vials for analysis. Then 1 µl was injected onto an Acquity™ UPLC BEH C18 1.7 µm 2.1 × 100 mm column (Waters) heated to 55 °C

at 0.7 ml.min⁻¹. Amino acids were detected at 260 nm using a photodiode array detector. The content of individual amino acids was expressed in μmol.g⁻¹ of dry weight with reference to the BABA internal standard and to the external calibration curves of amino acids.

2.4.6. Targeted profiling of phytohormones by ESI-TQD

Phytohormones were extracted as described by Fan *et al.* (2011) and refined by Poret *et al.* (2016) in preparation). Extraction was performed twice on 200 mg frozen fresh tissue with 1 ml of extraction buffer (MeOH/H₂O ; 80/20 with 1 % HCOOH). After 5 min in an ultrasonic bath at 4 °C, samples were agitated 30 min at room temperature and centrifuged at 12 000 g (10 min at 4 °C). The resulting supernatants were mixed and evaporated using a SpeedVac. Finally, the pellet was resuspended in 100 μL of methanol containing 1 % HCOOH buffer and then analyzed by UPLC-ESI(+/-)-TQD as described in Pan *et al.* (2010). Briefly, the extract obtained was analyzed on a reverse phase column coupled with a double detection in UV-Visible and by mass spectrometry triple quadrupole (Acquity of Waters), which allows a specificity and sensitivity compatible with the quantification of the phytohormones.

2.4.7. Determination of water soluble protein contents

Protein content was measured by the method of Coomassie blue according to (Bradford, 1976).

2.4.8. Non-targeted metabolomic profiling by LC-HRMS

The chromatographic separation was performed on an Ultimate 3 000 Dionex High Performance Liquid Chromatograph (HPLC, Thermo Fisher) mounted with a reverse phase Hypersil Gold C18 column (2.1 mm × 100 mm, 1.9 μm particle size, Thermo Fisher Scientific) maintained at 35 °C. Mobile phases consisted of water (A) and acetonitrile (B), both with 0.1 % acetic acid. A linear gradient was performed at 0.4 ml.min⁻¹ and started with 5 % of B for 2.40 min, then increased to 25 % at 4.50 min, 70 % at 11 min, 100 % at 14 min and 5 % at 19 min and held until 25 min. The LC system was coupled to a Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer (Q Exactive™, Thermo Fisher Scientific) with a Heated Electrospray Ionization source (HESI). The spectrometric parameters were set as follows: spray voltages: -3.0 kV and 3.0 kV in negative and positive mode respectively, sheath and auxiliary nitrogen flow-rates: 55 and 10 a.u (arbitrary units) respectively, capillary temperature: 350 °C, heater temperature: 300 °C. A polarity switching ion mode

with a mass range of m/z 65-975 was used at a mass resolving power of 70 000 Full Width Half Maximum (FWHM). Each day, external mass calibration was done with a Pierce™ LTQ Velos ESI Positive for the positive ionization mode and Pierce™ Negative for the negative ionization mode (Thermo Fisher Scientific). Prior to analyses, 10 μ l of the polar phase extract was dried at 25 °C under a gentle nitrogen flow and dissolved in 1,000 μ l ACN:H₂O (1:1, v/v). Then 5 μ l was injected in the LC-HRMS system. The sample sequences were randomly arranged to ensure that no run order bias was present in the resulting data and Quality Controls (QCs) corresponding to a fraction of each biological sample were inserted every 5 samples.

2.4.9. CAB & SAG expression

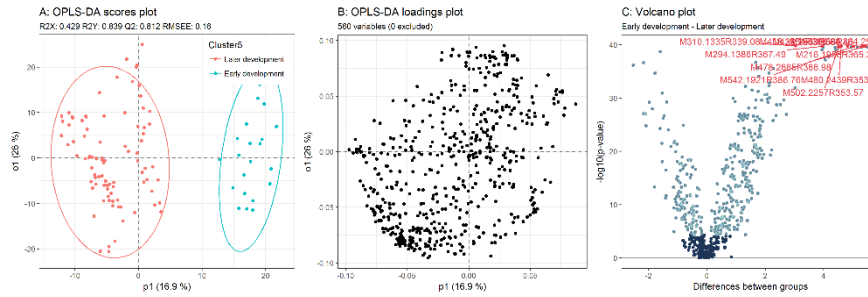
Total RNAs were extracted from 150 mg of ground frozen tissues by phenol extraction and lithium chloride precipitation as described by Verwoerd *et al.* (1989). The quantity and quality of RNAs were assessed by spectrophotometry with a NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). To remove contamination by genomic DNA, 2 μ g of total RNA was treated with RNase-free DNase I (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. The first strand cDNA was synthesized using 1 μ g of DNA-free RNA with Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) and oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Promega) following the manufacturer's recommendations. Molecular expression of *Brassica napus* Cab gene LHCII type I (AY288914) CAB, SAG12-1 (AF089848) and SAG12-2 (AF089849) genes of *B. napus* were measured by real-time PCR as described by Gombert *et al.* (2006).

2.4.10. Data analysis and annotations

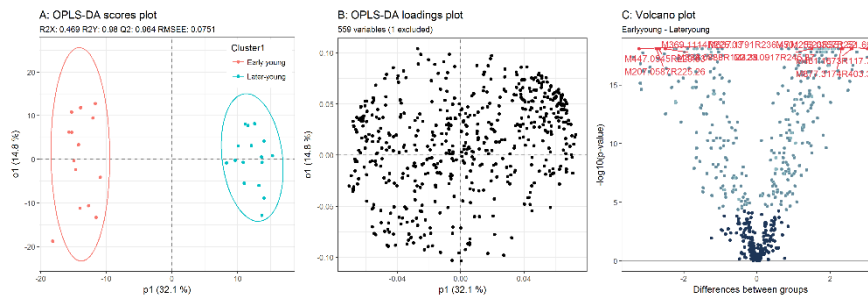
MSconverter tool was used to convert Xcalibur data files (*.raw) to open format (*.mzXML). Data were then processed under R environment version 3.3.0 (R Development Core Team, 2008) using RStudio interface (RStudio Team, 2015) and the following packages: "IPO" (Libiseller *et al.*, 2015) for determining optimal features detection parameters, "XCMS" (Tautenhahn *et al.*, 2008) for feature detection and grouping, "Workflow4Metabolomic" (Giacomoni *et al.*, 2015) for intra and inter-batch normalization under Galaxy, "CAMERA" (Kuhl *et al.*, 2012) for automatic pre-annotation of features, "ggplot2" (Wickham, 2016) for data representation, "FactoMineR" (Lê *et al.*, 2008) for principal component analysis, "factoextra" (Kassambara *et al.*, 2016) for clustering and "ropls" (Thévenot *et al.*, 2015) for multivariate discriminant analysis. Optimal feature detection parameters were calculated by "IPO" from QC samples for positive and negative

modes (peak width = 8-55 s; ppm = 8; mzdifff = 0.002/0.006 pos/neg; bw = 10). The stable retention time window used was from 80 to 950 sec, only the mass tags inside this range were used and those with more than 30 % of variation in QCs after normalization were discarded. A total of 2095 features were thus obtained (853 in positive and 1242 in negative mode). Isotopes, adducts and ions without at least its first isotope, were removed leaving 512 features. The exact mass of each feature was searched for in KEGG (Kanehisa and Goto, 2000) and AraCyc (Rhee *et al.*, 2006) compound databases with a threshold of 5 ppm. Annotations were manually curated to keep only probable compounds in *B. napus*, and kept only if there were (1) unique annotation and (2) unique exact mass in the whole dataset (supp. table III-I). Differences between clusters or between samples were tested using Wilcoxon test and were considered different when corrected *p-values*, using the false discovery rate (fdr), were below 0.05.

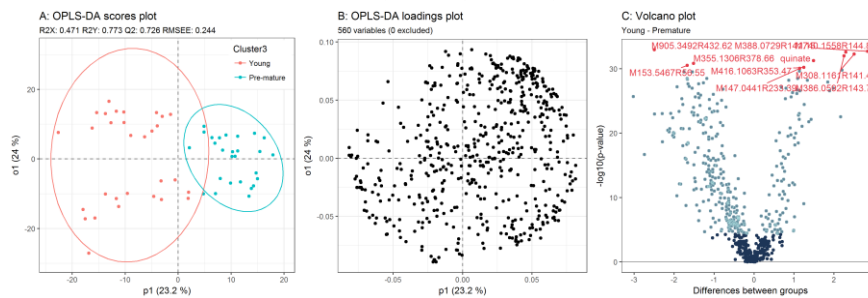
A Discriminant analysis between early and later development



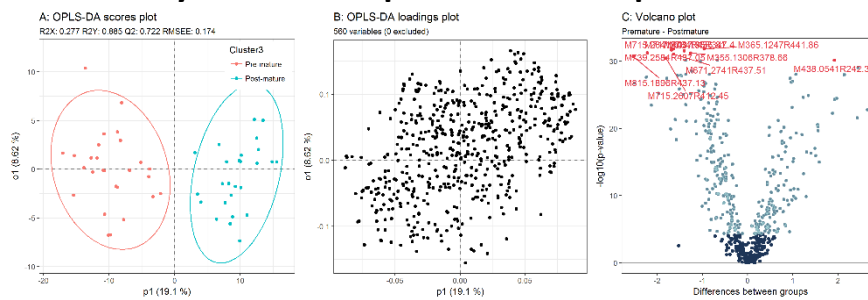
B Discriminant analysis between early and later young leaves



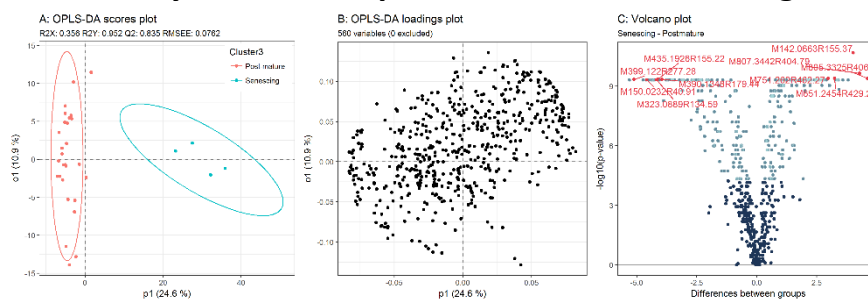
C Discriminant analysis between young and pre-mature leaves



D Discriminant analysis between pre-mature and post-mature leaves



E Discriminant analysis between post-mature and senescing leaves



Supplementary figure I-I: Discriminant analysis of metabolomic dataset between each leaves developmental stages.

Supplementary table I-I: List and Inchi Key of detected and annotated compounds (continued on next page).

| Compounds | Legende | Inchi |
|--------------|-------------------------------|--------------------------------|
| arabinose | arabinose | SRBFZHDQGSBBOR-HWQSCIPKSA-N |
| cellobiose | cellobiose | GUBGYTABKSRVRQ-CUHNMECISA-N |
| citrate | citrate | KRKNYBCHXYNGOX-UHFFFAOYSA-K |
| dulcitol | dulcitol | FBPFZTCFMRRESA-GUCUIZJISA-N |
| fructose | fructose | RFSUNEUAIZKAJO-VRPWFDPXSA-N |
| fumarate | fumarate | VZCYOOQTPPOCHFL-OWOJBTEDSA-N |
| galactinol | galactinol | VCWMRQDBPZKXKG-DXNLKLAMSA-N |
| galactose | galactose | WQZGKKKJIIFFOK-FPRJBGLDSA-N |
| gentiobiose | gentiobiose | DLRVVLDZNNYCBX-LIZSDCNHSA-N |
| glucose | glucose | WQZGKKKJIIFFOK-VFUOTHLCSA-N |
| glycerate | glycerate | OSJPPGNTCRNQQC-UWTATZPHSA-K |
| glycolate | glycolate | AEMRFAOFKBGASW-UHFFFAOYSA-N |
| glyoxylate | glyoxylate | HHLFWLYXYJOTON-UHFFFAOYSA-M |
| malate | malate | BJEPYKJPYRNKOW-REOHCLBHSA-L |
| maltose | maltose | GUBGYTABKSRVRQ-PICCSMPSSA-N |
| mannitol | mannitol | FBPFZTCFMRRESA-KVTDHHQDSA-N |
| mannose | mannose | WQZGKKKJIIFFOK-PQMKYFCFSA-N |
| melezitose | melezitose | QWIZNVHXZXRPRD-WSCXOGTSA-N |
| melibiose | melibiose | DLRVVLDZNNYCBX-ABXHMFFYSA-N |
| myo.inositol | myo.inositol | CDAISMWEOUEBRE-GPIVLXJGSA-N |
| quinat | quinat | AAWZDTNXLGCEK-WYWMIBKRSA-M |
| raffinose | raffinose | MUPFEKGTMRGPLJ-ZQSKZDJDSA-N |
| saccharose | saccharose | CZMRCDWAGMRECN-UGDNZRGBSA-N |
| sorbitol | sorbitol | FBPFZTCFMRRESA-JGWLITMVA-N |
| succinate | succinate | KDYFGRWQOYBRFD-UHFFFAOYSA-L |
| trehalose | trehalose | HDTRYLNUVZCQOY-LIZSDCNHSA-N |
| xylitol | xylitol | HEBKCHPVOIAQTA-NGQZVQHPSA-N |
| xylose | xylose | SRBFZHDQGSBBOR-IOVATXLUSA-N |
| a.ala | alpha-alanine | QNA YBMKLOCPY GJ-REOHCLB HSA-N |
| arg | arginine | ODKSFYDXXFIFQN-BYPYZUCNSA-N |
| asn | asparagine | DCXYFEDJOCNFA-REOHCLB HSA-N |
| asp | aspartate | CKLJMWTZIZZHC-REOHCLB HSA-N |
| b.ala | beta-alanine | UCMIRNVEIXFBKS-UHFFFAOYSA-N |
| cys | cystine | LEVWYRKDKASIDU-IMJSIDKUSA-N |
| GABA | gamma-aminobutyric acid | BTCSSZJGUNDROE-UHFFFAOYSA-N |
| glu | glutamate | WHUUTDBJXJRKM-KVHKMYHEASA-N |
| gln | glutamine | ZDXPYRJPNDTMRX-KVHKMYHEASA-N |
| gly | glycine | DHMQDGOQFOQNFH-UHFFFAOYSA-N |
| his | histidine | HNDVDQJCIGZPNO-YFKPBYRVSA-N |
| h.pro | hydroxyproline | PMMYEEVYMWASQN-DMTCNVIQSA-N |
| ile | isoleucine | AGPKZVBTJJNPAG-WHFBIAKZSA-N |
| leu | leucine | ROHFNLRQFUQHCH-YFKPBYRVSA-N |
| lys | lysine | KDXKERNBIXSRK-YFKPBYRVSA-N |
| met | methionine | FFEARJCKVFRZRR-BYPYZUCNSA-N |
| methyl.cys | methyl-cysteine | IDIDJDIHTAOVLG-KVHKMYHEASA-N |
| orn | ornithine | AHLPHDHHMVZTML-BYPYZUCNSA-N |
| phe | phenylalanine | COLNVLDHVKWLRT-QMMMGPBSA-N |
| pro | proline | ONIBWKKTOPOVIA-BYPYZUCNSA-N |
| ser | serine | MTCFGRXMJLQNBG-REOHCLB HSA-N |
| SMCSO | S-methyl-L-cysteine sulfoxide | ZZLHPCSGGOGHFW-BUKSALPDSA-N |
| thr | threonine | AYFVYJQAPQTCCC-GBXIIJLDSA-N |
| trp | tryptophane | QIVBCDIJAJPQS-VIFPVBQESA-N |
| tyr | tyrosine | OUYCCCASQSFEME-QMMMGPBSA-N |
| val | valine | KZSNJWFQEVHDMF-BYPYZUCNSA-N |
| ABA | abscissic acid | JLIDBLDQVAYHNE-LXGGSRLISA-N |
| GA3 | gibberellin A3 | IXORZMNAPKEEDV-OB DJNFBSA-N |
| GA4 | gibberellin A4 | RSQSQJNRHICNNH-NFMPGMCNSA-N |
| IAA | indole-3-acetic acid | SEOVTRFCIGRIMH-UHFFFAOYSA-M |

| Compounds | Legende | Inchl |
|----------------------|--|-------------------------------|
| IAA | indole-3-acetic acid | SEOVTRFCIGRIMH-UHFFFAOYSA-M |
| I.Ala | N-(3-Indolylacetyl)-L-alanine | FBDCJLXTUCMFLF-QMMMGOBSA-N |
| IBA | Indole-3-butyric acid | JTEDVYBZBROSJT-UHFFFAOYSA-M |
| ICA | 1H-Indole-3-carboxylic acid | KMAKOBLIOCQJJP-UHFFFAOYSA-M |
| I.Leu | N-(3-Indolylacetyl)-L-leucine | HCZNPVHZYPPINM-AWEZNRQCLSA-N |
| JA | jasmonic acid | ZNJFBWYDHIGLCU-HWKXXFMVSA-M |
| JA.Ile | (-)-jasmonoyl-L-isoleucine | IBZYPBGPOGJMBF-QMAGESQGSAM |
| N.acetyl.L.ornithine | N-acetyl-L-ornithine | JRLGPAXAGHMNOL-LURJTMIESA-N |
| OPDA | 13-epi-12-oxo-phytodienoic acid | PMTMAFAPLCGXGK-CLTKARDFSA-M |
| SA | salicylic acid | YGSDEFSMJLZEOE-UHFFFAOYSA-M |
| 4aminobenzoicacid | 4-aminobenzoic acid | ALYNCZNDIQEVRV-UHFFFAOYSA-M |
| I.Acet | indole-3-acetamide | ZOAMBXDOGPRZLP-UHFFFAOYSA-N |
| IAN | indole-3-acetonitrile | DMCFPBLJMLSX-HWKXXFMVSA-N |
| IP | isopentenyladenine | HYVABZIGRDEKCD-UHFFFAOYSA-N |
| IPR | isopentenyladenosine | USVMJSALORZVDV-SDBHATRESA-N |
| Me.JA | methyl jasmonate | GEWDNTWNSAZUDX-WQMVMXFAESA-N |
| Zeatin | zeatin | UZKQTCBAMSWPJD-FARCUNLSSA-N |
| ZeatineR | zeatineR | GOSWTRUMMSCNCW-HNNGNKQASA-N |
| M295.0463R277.38 | (R)-4'-phosphopantothenate | XHFVGHGPGDLDEQO-ZETCQYMMSA-K |
| M181.0495R144.47 | 2,4-Dihydroxycinnamate | HGEFWFBFQKWVWY-RQOWECAXSA-M |
| M215.0331R40.92 | 2-C-Methyl-D-erythritol 4-phosphate; MEP | XMWHRVNVKDKBRG-UHNVWZDZSA-N |
| M224.0567R63.12 | 4-Amino-4-deoxychorismate | OIJHGFOLFKDBSU-HTQZYQBOSA-N |
| M147.0453R90.76 | 4-Coumaraldehyde | CJXMVYKYNVIGQBS-OWOJBTEDSA-N |
| M463.0495R93.45 | 4-Hydroxyglucobrassicin | CSMYCLLHRFFFLG-WVGMVVCISA-N |
| M337.0935R237.65 | 4-Methylumbelliferyl Glucoside | YUDPTGPSBJVHCN-YMILTQATSA-N |
| M225.1484R336.99 | 5,6-Epoxy-3-Hydroxy-9-Apo-Beta-Caroten-9-One | VYKLRWGPNUVKNC-AATRIKPKSA-N |
| M193.0508R322.9 | 5-Hydroxy-Coniferaldehyde | IEHPLRVWOHZKCS-NSCUHMNNSA-N |
| M579.2096R350.99 | Acanthoside B | WEKCEGQSIIQPAQ-IRBNZIFYSAN |
| M136.0618R55.39 | Adenine | GFFGJBXGBJISGV-UHFFFAOYSA-N |
| M339.109R399.24 | Coniferaldehyde Glucoside | PJFKUPRDDXTASO-FAOXUISGSA-N |
| M147.0441R233.39 | Coumarin | ZYGHJZDHTFUPRJ-UHFFFAOYSA-N |
| M772.2047R257.58 | Cyanidin 3,5,3'-tri-O-glucoside | ZOEXTKFPHTFWDY-PQOFYMSA-O |
| M352.0648R117.27 | DARP | OCLCLRKNJCQID-UUMMCLCDSA-N |
| M177.0195R277.47 | Esculetin | ILEDWLMCKZNDJK-UHFFFAOYSA-N |
| M265.1546R259.57 | Feruloylputrescine | SFUVCMKSYKHYLD-FNORWQNLSA-N |
| M438.0541R242.33 | Glucobarbarin | GAPDDBFHNYHZIS-LNUNAXHXSA-N |
| M386.0592R143.78 | Glucobrassicinapin | XMJFVIGTHMOGNZ-AHMUMSBHSA-N |
| M447.0545R229.83 | Glucobrassicin | DNDNWOWHUWNBCK-JZYAIQKZSA-N |
| M372.0434R74.47 | Gluconapin | PLYQBXXHVYUJNQB-IIPHORNSSA-N |
| M422.0593R274.91 | Gluconasturtiin | CKIJGYDFNXSET-OOMJLXHVSA-N |
| M177.0546R319.5 | Herniarin | LIIALPBMIOVAHH-UHFFFAOYSA-N |
| M146.0601R78.73 | Indole-3-Carboxaldehyde | OLNJUISKUQQNIM-UHFFFAOYSA-N |
| M369.1114R225.03 | Indolylmethyl-Desulfoglucosinolate | CWNIQCOMWQROPA-NMIPTCLMSA-N |
| M207.0587R225.26 | Indolylmethylthiohydroximate | NPTAQBFHUNRJAR-UHFFFAOYSA-N |
| M649.1429R322.31 | Malonylapiin | JNAHTYWPEQLJRT-CQRLEKJLSA-N |
| M477.065R283.04 | Neoglucobrassicin | PKKMITFKYRCCOL-RTLJINITSAM |
| M179.108R398.77 | Olivetol | IRMPFYJSHJGOPE-UHFFFAOYSA-N |
| M218.1036R116.1 | Pantothenate | GHOKWGTUZEJQD-ZETCQYMMSA-M |
| M576.074R303.5 | PhosphoribosylformiminoAICAR-P | QOUSHGMTBIIAHR-KEOHSTQSA-J |
| M299.0776R235.72 | Salicylate beta-D-glucose ester | XNHKMHZWRNMFUCU-HMUNZLLOLSA-N |
| M353.0884R147.3 | Scopolin | SGTCGCCQZOOMJJ-YMILTQATSA-N |
| M209.0809R241.87 | Sinapaldehyde | CDICDSOGTRCHMG-ONEGZTNSA-N |
| M229.0859R128.73 | Trans-Resveratrol | LUKBXSAWLPMMSSZ-OWOJBTEDSA-N |
| M190.091R206.8 | Trihomomethionine | UKDJCWUSWYBRDM-ZETCQYMMSA-N |
| M161.0245R255.18 | Umbelliferone | ORHBXUUXSCNDEV-UHFFFAOYSA-N |

Tableau I-I : Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé afin de vérifier l'indépendance des données mesurées entre trois réplicas biologiques. Les métabolites significativement différents entre les réplicas sont indiqués à gauche (*p-value* inférieure à 0,05), et les métabolites n'ayant pas de différence significative entre les réplicas sont indiqués à droite (*p-value* supérieure à 0,05).

| p-value inférieure à 0.05 | | | | p-value supérieure à 0.05 | | | |
|---------------------------|----------|---------------|----------|---------------------------|---------|------------|---------|
| Métabolite | p.value | Métabolite | p.value | Métabolite | p.value | Métabolite | p.value |
| Alpha-Alanine | 5.91E-06 | Isoleucine | 9.98E-10 | Beta-Alanine | 0.270 | Saccharose | 0.435 |
| Ammonium | 1.49E-02 | Leucine | 3.14E-10 | Citrate | 0.133 | Sorbitol | 0.449 |
| Arginine | 1.53E-04 | Lysine | 6.70E-08 | Galactose | 0.081 | Succinate | 0.697 |
| Asparagine | 1.17E-04 | Malate | 1.97E-08 | Histidine | 0.055 | | |
| Aspartate | 7.75E-12 | Méthionine | 2.57E-07 | Hydroxyproline | 0.513 | | |
| Cystéine | 1.52E-05 | Phénylalanine | 6.63E-10 | Mannose | 0.812 | | |
| Fructose | 2.25E-04 | Serine | 2.00E-02 | Mélibiose | 0.393 | | |
| GABA | 2.01E-03 | SMCO | 5.35E-09 | Méthylcysteine | 0.511 | | |
| Glucose | 8.21E-03 | Threonine | 9.45E-09 | Myo-Inositol | 0.392 | | |
| Glutamate | 2.07E-08 | Tryptophane | 1.83E-10 | Ornithine | 0.080 | | |
| Glutamine | 3.97E-07 | Tyrosine | 1.54E-02 | Proline | 0.055 | | |
| Glycérate | 1.48E-02 | Valine | 2.89E-06 | Quinate | 0.519 | | |
| Glycine | 2.25E-07 | | | | | | |

| Mesure spectrale | p.value | Mesure spectrale | p.value |
|------------------|----------|------------------|---------|
| Composante verte | 6.75E-10 | Composante bleue | 0.466 |
| Composante rouge | 4.36E-10 | | |

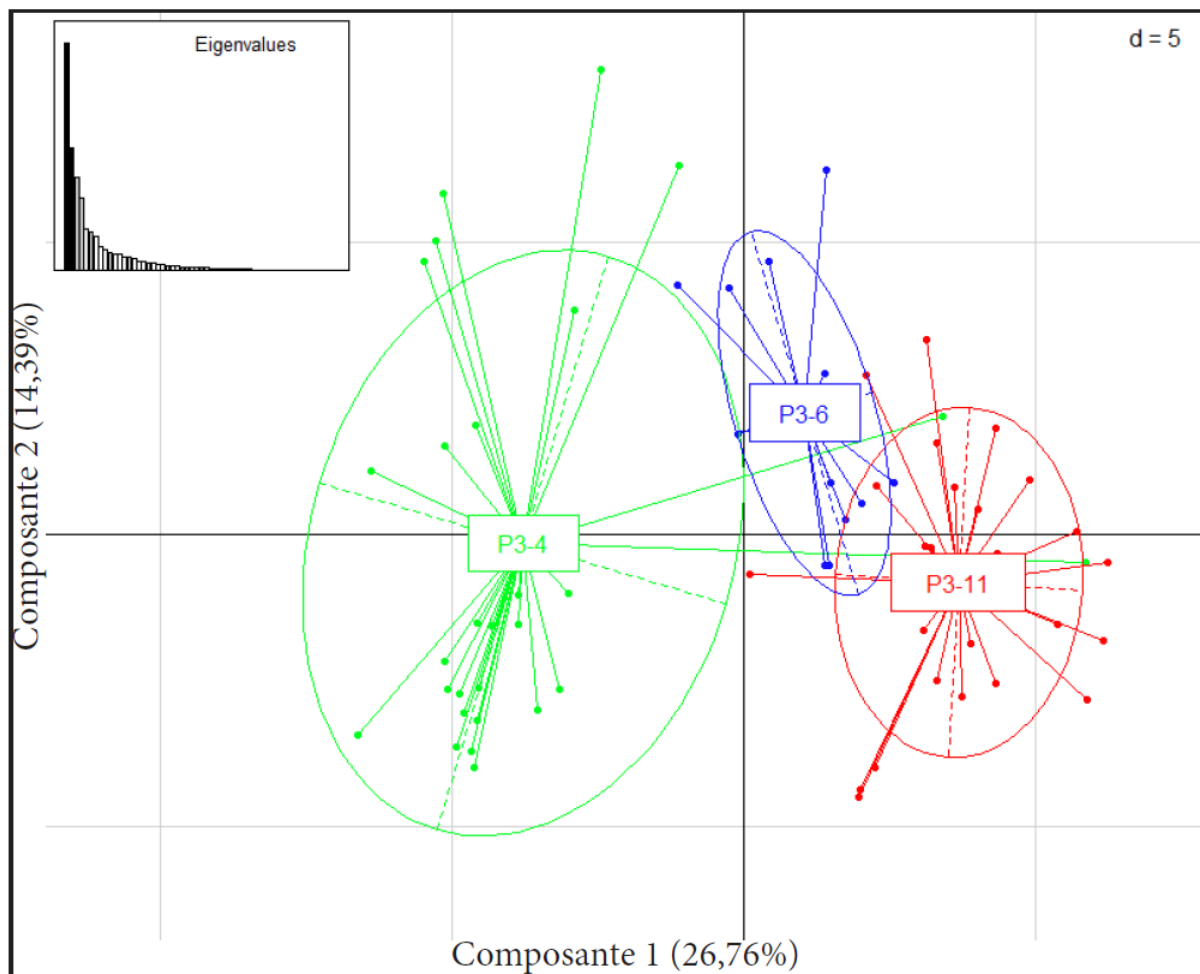


Figure I-8 : Répartition des trois répétitions biologiques sur les deux premiers axes factoriels de l'analyse en composante principale. Chaque point correspond à une fraction de limbe foliaire. Le plan factoriel représente 41,15 % de l'information.

3. Cartographie spatiale et temporelle du métabolisme associé à la sénescence foliaire

3.1. Introduction

Le travail a consisté, chez le génotype Aviso, par des approches ciblées de profilage métabolique, à établir une cartographie métabolique spatio-temporelle de la progression de la sénescence foliaire afin d'en révéler les attributs moléculaires susceptibles de contribuer à l'efficacité de recyclage et de réallocation de ressources trophiques, notamment azotées, vers les organes en croissance. Un préalable a consisté, par des méthodes non invasives, à délimiter dans le temps et l'espace, l'évolution de l'ontogenèse et du vieillissement foliaires et la mise en place et la progression de la sénescence.

3.2. Résultats

3.2.1. Variabilité de l'analyse métabolique à l'échelle de plantes différentes

La réalisation d'une cartographie métabolique à partir de fractions de limbes foliaires de 6,25 cm² impose de vérifier la variabilité biologique à partir de plantes différentes, notamment à cause du fait que la totalité du prélèvement, pour des raisons de sensibilité analytique, est utilisée pour une seule détermination. La variabilité biologique a ici été évaluée à partir de prélèvements réalisés sur trois plantes. Le test statistique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour vérifier si les variables mesurées appartiennent à la même population. Avec un seuil d'erreur de 5 %, 25 métabolites sur les 40 mesurés ainsi que deux mesures spectrales (les composantes rouge et verte) diffèrent significativement entre les trois réplicats (tableau I-I). La variation entre les prélèvements est confirmée par l'analyse en composante principale. En effet, les trois répétitions biologiques sont distinctement séparées sur le plan factoriel (figure I-8). Les points correspondent aux zones de prélèvement, et très peu se recoupent entre les trois répétitions. Ces résultats montrent bien la difficulté d'analyser les mêmes rangs foliaires à un stade développemental synchronisé. En effet, les mesures spectrales (teneurs en chlorophylles et Fv/Fm) mesurées entre les trois feuilles échantillonnées varient respectivement de 6,7

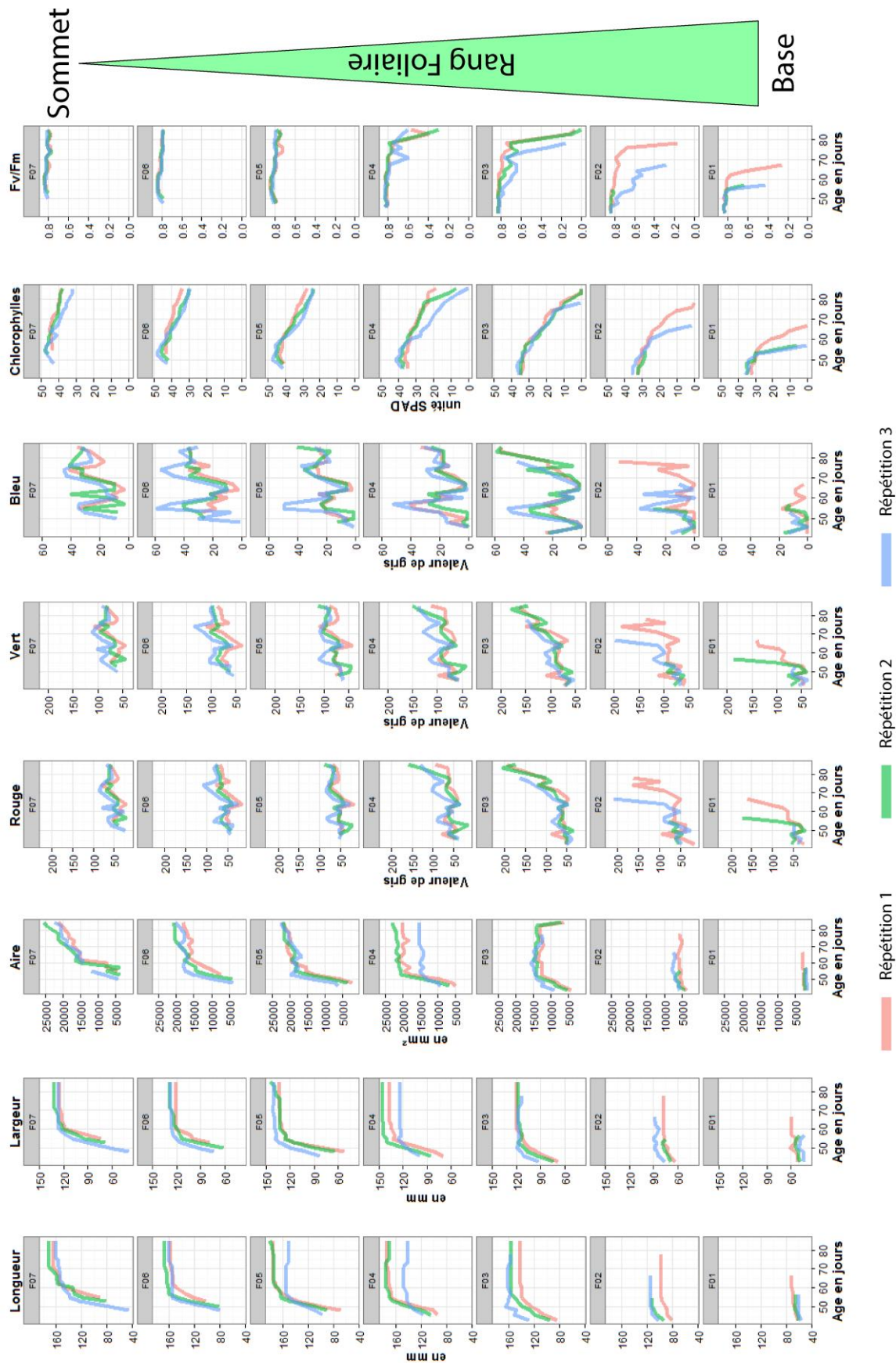


Figure I-9 : Résultats des mesures spectrales et de croissance correspondant aux sept premiers étages foliaires au cours de leur développement.

à 10,7 et de 0,79 à 0,82 U. SPAD, ce qui montre un léger décalage ontogénétique entre les trois organes.

3.2.2. Approche macroscopique de l'évaluation de la progression de la sénescence foliaire

Progression de la sénescence à l'échelle de la plante

La dynamique de développement des tissus foliaires de colza et la progression de la sénescence ont été appréciées par des mesures non-invasives de croissance : la longueur, largeur et l'aire des feuilles, et par des mesures spectrales exprimant la teneur en chlorophylles et l'efficacité des photosystèmes II par le rapport Fv/Fm. L'objectif est de pouvoir disposer de procédures d'évaluation simples, rapides et non-destructives du développement des tissus foliaires à une échelle spatiale aussi affinée que possible afin d'assurer un prélèvement objectif pour la caractérisation biochimique de ces tissus, s'agissant de leur niveau de maturité et de l'état d'avancement de la sénescence. Les sept premiers étages foliaires de trois plantes de même âge ont été suivis (figure I-9). Les mesures directement liées à la croissance permettent de déterminer la durée nécessaire aux feuilles pour atteindre leur taille maximale, qui est d'environ 10 jours dans les conditions de cultures (ligne verte sur la figure I-10) ainsi que leur durée de vie (d'une trentaine de jours pour les premières feuilles, jusqu'à plusieurs mois pour les dernières feuilles). La surface maximale des feuilles est importante dans le contexte de l'étude afin de réaliser des prélèvements suffisants de fractions de limbes. Elle est atteinte à partir du rang 4 (180 cm²). La teneur en chlorophylles commence à diminuer 2 jours avant que les feuilles atteignent leur taille maximale, puis progressivement jusqu'à leur chute (figure I-10). La vitesse de dégradation des chlorophylles est de l'ordre de -0,75 U. SPAD/jour pour les feuilles de rangs 1 et 2. Elle diminue progressivement pour atteindre -0,50 U. SPAD/jour dans les feuilles de rangs 6 et 7 (figure I-9). L'apparition des symptômes visibles de la sénescence est révélée par l'augmentation des composantes rouge et verte de l'image numérisée du limbe, traduisant un jaunissement des feuilles (ligne rouge sur la figure I-10). Ce changement de coloration débute alors que la teneur en chlorophylles a chuté d'environ 50 %, puis est immédiatement suivi par une chute du rapport Fv/Fm. Les corrélations entre les variables ont été étudiées en réalisant une analyse en composante principale (figure I-11). Les mesures de longueurs, de largeurs et d'aires sont fortement corrélées entre elles et permettent de séparer distinctement les rangs foliaires 1, 2 et 3 à 7 qui ont une morphologie très contrastée. Ces variables sont indépendantes des variables physiologiques (la teneur en chlorophylle et le rapport

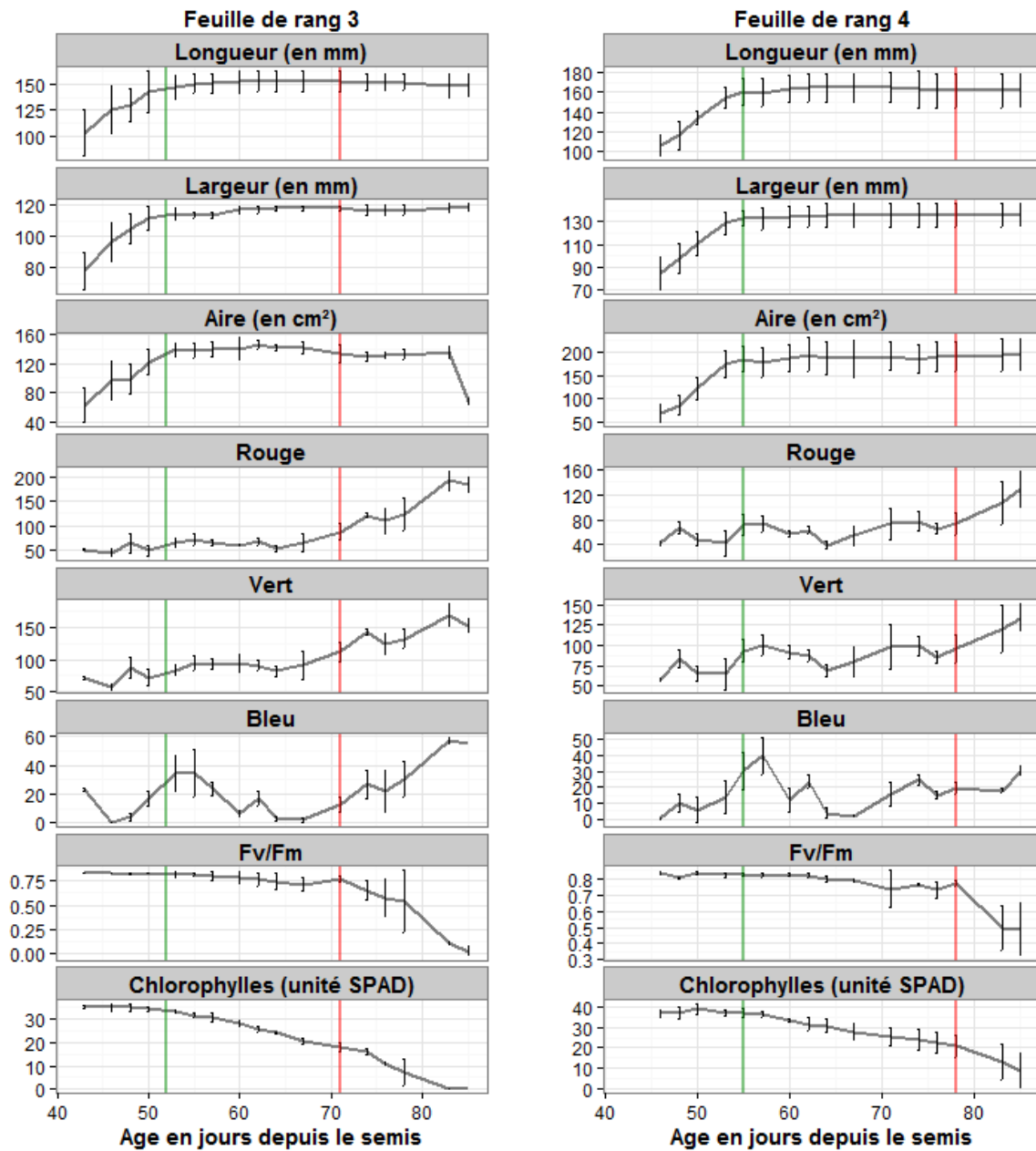


Figure I-10 : Evolution de la taille (longueur, largeur et surface) et de caractéristiques spectrales (RGB, Fv/Fm, Chlorophylles) des limbes foliaires des feuilles de rang 3 (à gauche) et 4 (à droite) correspondant aux premières feuilles avec une surface supérieure à 120 cm². Les marqueurs verts correspondent à la date de fin de croissance des feuilles. Les marqueurs rouges correspondent à la date de changement de coloration des feuilles.

Fv/Fm) et des variables de colorations (Rouge, Vert et bleu) qui sont corrélées négativement. Les corrélations entre les variables ont été confirmées statistiquement par la méthode de Pearson (tableau I-II).

Progression de la sénescence à l'échelle du limbe foliaire

Il a été montré dans la partie précédente que le changement de coloration des feuilles débute alors que la teneur en chlorophylles des feuilles a déjà chuté de 50 %. L'objectif est de visualiser l'hétérogénéité de la progression de la sénescence à l'échelle du limbe foliaire en réalisant une cartographie de la teneur en chlorophylles d'une feuille entrée en sénescence. Le rang foliaire a été choisi à partir des données moyennes de teneurs en chlorophylles relevées sur l'ensemble des feuilles de trois plantes (figure I-12). La feuille de rang 6 a une teneur moyenne en chlorophylles de 21 U. SPAD correspondant à 50 % de sa teneur maximale en chlorophylles qui a été associée précédemment au début de l'apparition des symptômes visibles de la sénescence. La photographie numérique de la feuille permet effectivement de voir un début de décoloration au niveau de la partie apicale alors que la partie basale est encore verte (à droite sur la figure I-13). La cartographie de la teneur en chlorophylles associée à cette feuille (à gauche sur la figure I-13) permet de mettre en évidence un gradient basipète qui progresse de la partie apicale (moyenne de 23 U. SPAD) vers la partie basale (moyenne de 31 U. SPAD) avec une faible hétérogénéité des valeurs sur le plan horizontal. En effet la déviation standard associée aux moyennes horizontales est de 1 à 3 U. SPAD. Il est également important de noter que la dégradation des chlorophylles sur cette feuille ne progresse pas de manière symétrique de part et d'autre de la nervure centrale, elle est plus avancée sur la partie droite. Pour vérifier si cette progression asymétrique est une particularité, cette cartographie a été réalisée sur plusieurs plantes et sur plusieurs rangs foliaires (données non renseignées). Il apparaît que ce phénomène est variable d'une plante à l'autre et plus particulièrement prononcé sur les feuilles les plus âgées (rangs 1 à 6), cette variabilité pouvant être imputable à des facteurs environnementaux comme le rayonnement lumineux qui est moins homogène au niveau des premiers étages foliaires (les plus bas et les plus âgés).

3.2.3. Approche métabolique ciblée de l'évaluation de la progression de la sénescence foliaire

Profils métaboliques de feuilles entières à l'échelle de la plante

Afin d'éprouver la performance des techniques analytiques et de disposer d'un référentiel qui traduise le profil métabolique de feuilles de colza dans deux situations ontogénétiques

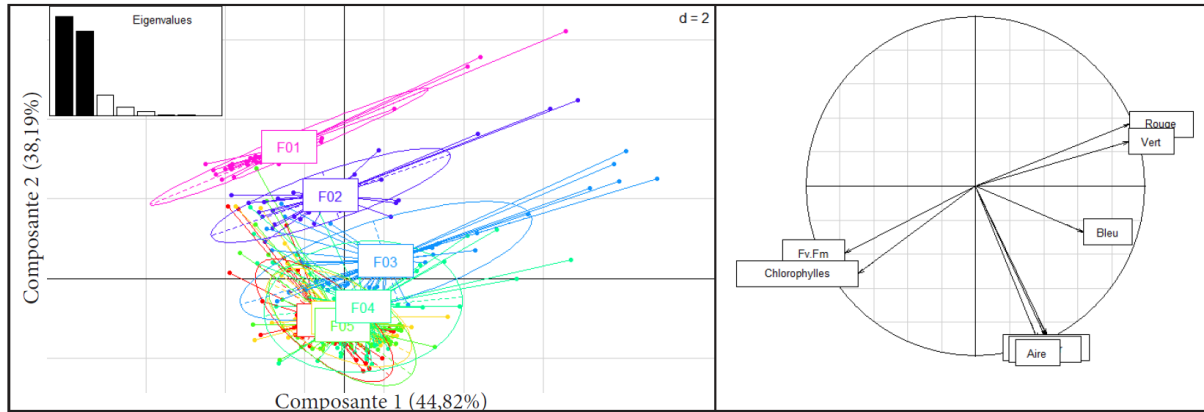


Figure I-11 : Analyse en composante principale des données macroscopiques mesurées sur les 7 premiers étages foliaires sur une période de 80 jours. Le plan factoriel représente 83,01 % de l'information et permet de séparer les étages foliaires (à gauche) grâce aux mesures morphologiques (longueur, largeur et aire). L'hétérogénéité des points au sein des groupes est attribuée aux mesures physiologiques (Chlorophylles et Fv/Fm) et de coloration (Rouge et Vert) (à droite).

Tableau I-II : Coefficients de corrélation de Pearson entre les variables mesurées et les p-values associées. En vert les corrélations supérieures à 0,70 et les p-values inférieures à 0,001. En rouge les corrélations inférieures à 0,70 et en bleu les p-values inférieures à 0,05.

| | | Coefficients de corrélations | | | | | | |
|---------|-----------------|------------------------------|-------------|--------------|-------------|-------------|--------------|----------------------|
| p-value | Longueur | 0.964 | 0.938 | 0.041 | 0.126 | 0.389 | -0.024 | 0.109 |
| | <0.001 | Largeur | 0.951 | 0.038 | 0.127 | 0.372 | 0.000 | 0.111 |
| | <0.001 | <0.001 | Aire | -0.006 | 0.086 | 0.396 | 0.073 | 0.149 |
| | >0,05 | >0,05 | >0,05 | Rouge | 0.951 | 0.507 | -0.791 | -0.756 |
| | <0.05 | <0.05 | >0,05 | <0.001 | Vert | 0.504 | -0.671 | -0.708 |
| | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | Bleu | -0.294 | -0.068 |
| | >0,05 | >0,05 | >0,05 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | Fv/Fm | 0.735 |
| | >0,05 | >0,05 | <0.05 | <0.001 | <0.001 | >0,05 | <0.001 | Chlorophylles |

très contrastées (**axe vertical**), l'analyse a été réalisée dans un premier temps à partir de jeunes feuilles en phase d'expansion (de rang 8) considérées comme des organes puits et de feuilles en phase de sénescence avancée (de rang 2) considérées comme des organes sources vieillissants. Les préoccupations analytiques concernent essentiellement les métabolismes primaires carbonés et azotés associés aux processus de recyclages des macromolécules foliaires en métabolites mobilisables par voie phloémienne vers les organes puits. Elles concernent également le profilage des phytohormones reconnues pour leurs effets régulateurs essentiels des processus d'induction et de contrôle de la dynamique de la sénescence. Le métabolisme azoté d'intérêt a été appréhendé par le dosage des amines et des acides aminés libres par UPLC-DAD (25 composés identifiés et 10 composés inconnus notés « UK »). Le métabolisme carboné a été décrit par le dosage des sucres non structuraux et des acides organiques par GC-FID (13 composés identifiés et 2 composés inconnus notés « UK »). Les phytohormones ont été dosées par UPLC-MS/MS (12 composés identifiés). Une analyse discriminante par régression des moindres carrés partiels (PLS-DA) a été réalisée afin de déterminer les métabolites marqueurs de ces deux statuts développementaux contrastés. Le premier axe du plan factoriel représente 97,62 % de la variance et permet de séparer très distinctement les feuilles sénescentes (en rouge sur la [figure I-14A](#)) des feuilles en croissance (en vert sur la [figure I-14A](#)). Ce type d'analyse permet d'isoler les variables importantes dans la projection (VIPs) en attribuant un score à chacune des variables (VIPs score) en fonction de leur contribution à la dispersion analytique. Trente-trois VIPs ont un score supérieur à 1 et sont représentées sur la [figure I-14B](#). Les VIPs scores ont été orientés en fonction du sens des corrélations sur le plan factoriel en attribuant un score négatif aux variables corrélées négativement à la première composante et un score positif aux variables corrélées positivement à cette même composante. Ainsi les feuilles sénescentes sont caractérisées par des valeurs de teneurs élevées en deux sucres : le galactose et le maltose, deux acides aminés : la phénylalanine et le tryptophane, un composé de nature phytohormonale : le PABA, ainsi qu'un composé non identifié détecté par GC-FID : UK8.205. La coloration jaune de la feuille sénescence est traduite ici par des valeurs élevées des composantes rouge et verte intégrées à l'analyse métabolique. Les feuilles en croissance sont caractérisées par une teneur plus élevée en deux glucides : le myo-inositol et le saccharose, trois acides organiques : le glycérate, le malate et le quinate, huit acides aminés : l'alpha-alanine, l'asparagine, l'aspartate, le GABA, le glutamate, la glutamine, la sérine et la thréonine, et 6 composés à caractère phytohormonal : l'IAA, l'I-Acet, l'IAN, l'ICA, l'OPDA et la Z, ainsi que quatre composés non identifiés (UK3.467, UK5.372, UK5.756 et

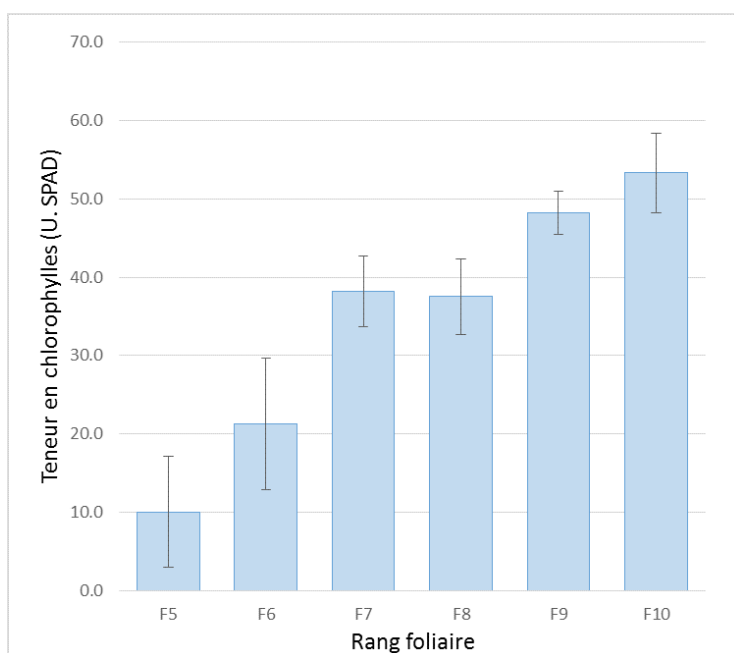


Figure I-12 : Teneurs en chlorophylles moyennes en fonction des étages foliaires (5 à 10). Les mesures ont été réalisées chez trois plantes âgées de 80 jours.

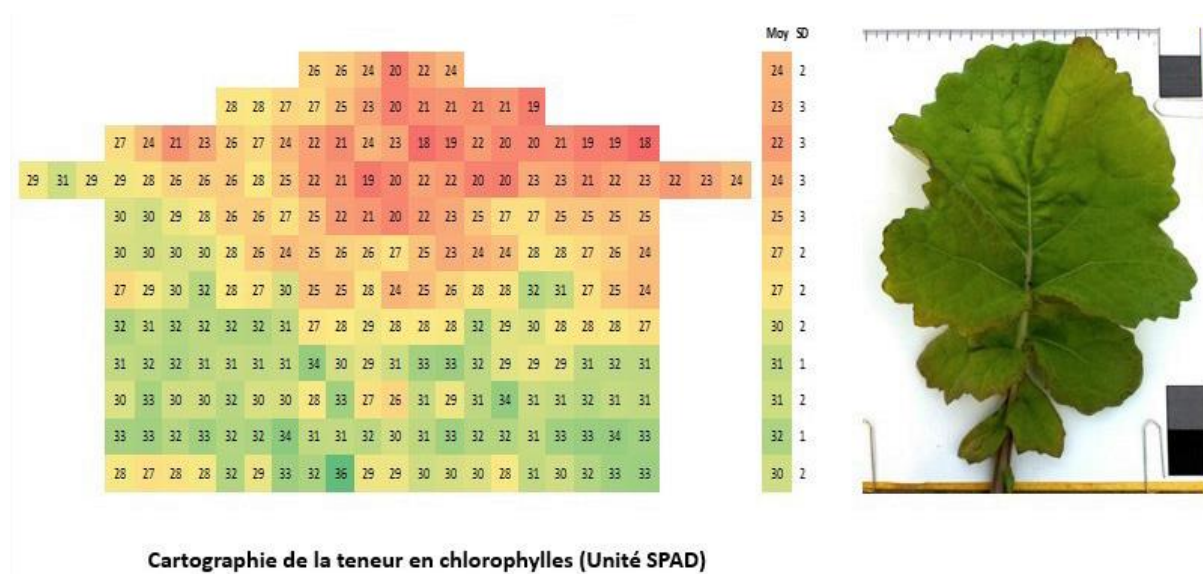


Figure I-13 : Cartographie de la teneur en chlorophylles d'une feuille de rang 6 (à gauche) et photographie numérique de cette même feuille (à droite) réalisées chez une plante âgée de 80 jours. Les moyennes horizontales de la teneur en chlorophylles (Moy.) ainsi que les déviations standards associées (SD) sont indiquées (au milieu).

UK7.608) détectés par UPLC-DAD. L'analyse discriminante permet ainsi d'isoler les métabolites les plus discriminants, mais il est nécessaire de revenir aux données brutes et de réaliser des tests statistiques pour s'assurer de leur valeur explicative. Le nombre de répétitions a permis d'utiliser le test de Kruskal-Wallis. En acceptant un seuil d'erreur de 5 %, l'ensemble des métabolites avec un VIP score supérieur à 1 excepté le succinate sont significativement différents entre une feuille de rang 2 et une feuille de rang 8. La concentration de chacun de ces métabolites dans les deux organes foliaires est indiquée sur la [figure I-15](#).

Profils métaboliques associés à la progression du vieillissement à l'échelle du limbe foliaire

L'analyse de mesures spectrales associées au développement des feuilles de rang 1 à 7 a permis d'apprécier la dynamique de progression de la sénescence à l'échelle de la plante et des feuilles entières. Ces informations ont permis d'orienter l'échantillonnage afin d'identifier les changements métaboliques d'un rang foliaire donné qui interviennent au cours de la sénescence (**axe horizontal**). Le choix du rang foliaire étudié repose sur les critères suivants : tout d'abord le découpage des feuilles en parcelles de 6,25 cm² nécessite d'avoir une surface foliaire importante, qui n'est retrouvée qu'à partir du rang 2, et régulière, qui n'est retrouvée qu'avant le rang 6. L'aire maximale des feuilles a été mesurée pour le rang 4, et l'analyse en composante principale a montré que les feuilles de rangs 4 à 7 sont homogènes pour les paramètres mesurés. Les feuilles de rang 4 à 6 constituent donc des supports d'étude pertinents. Ensuite la durée entre la fin de la croissance de la feuille de rang 4 et sa chute dure 50 à 60 jours, alors que cette durée est rallongée pour les feuilles de rangs supérieurs. Sur la base de ces résultats, le profilage métabolique de fractions de limbes foliaires a été réalisé sur des feuilles de rang 4 âgés de 32, 68 et 96 jours. L'objectif de cette approche est d'identifier des métabolites régulateurs et effecteurs des processus de remobilisation de l'azote et du carbone au cours de la sénescence, d'une part à l'échelle de la feuille entière, et d'autre part à l'échelle de fractions du limbe.

Afin d'identifier les métabolites permettant de discriminer l'âge de la feuille, une première analyse discriminante (PLS-DA) a été réalisée ([figure I-16](#)). Le plan factoriel représenté par les deux premières composantes de la PLS-DA représente 99,25 % de la variance des données et permet de séparer très clairement les trois stades développementaux de la feuille ([figure I-16A](#)). L'information métabolique concernant la feuille en période de fin de croissance (âgée de 32 jours), et celle concernant cette même

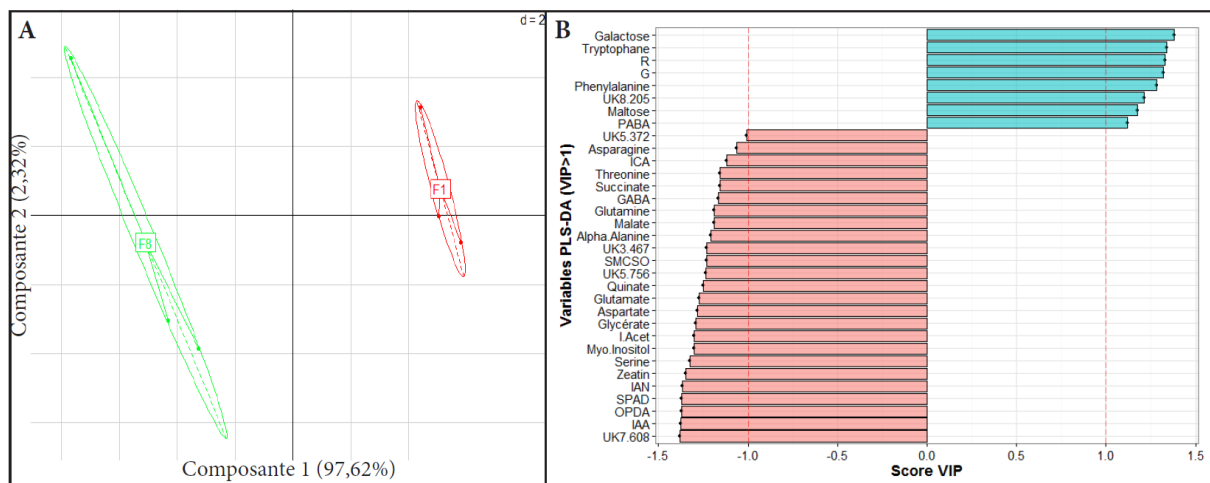


Figure I-14 : PLS-DA représentant la séparation des feuilles sénescents (en rouge) et des feuilles en croissance (en vert) sur l'axe factoriel (A). La composante horizontale représente 97,62 % de la variabilité totale. (B) Histogramme des variables qui ont un score VIP supérieur à 1 (Variables Importantes dans la Projection). Les scores en bleu correspondent aux métabolites retrouvés dans les feuilles sénescents et les scores en rouge correspondent aux métabolites retrouvés dans les feuilles en croissance.

feuille en cours de sénescence (âgée de 68 jours) sont séparées par la première composante. Ces deux espaces sont séparés des données métaboliques concernant la feuille en fin de sénescence (âgée de 96 jours) par la deuxième composante. Afin d'en clarifier la lisibilité, seules les variables avec un score VIP supérieur à 1 ont été représentées sur le cercle des corrélations (figure I-16B). D'après cette analyse, la feuille âgée de 32 jours est discriminée de la précédente par des concentrations plus élevées en deux composés de nature phytohormonale : l'I-Acet et l'IAN, en deux glucides : le saccharose et le sorbitol, un acide organique : le malate, et un acide aminé : l'alpha-alanine. La feuille âgée de 68 jours est discriminée par des concentrations plus élevée en IAA, raffinose, galactinol, galactose, ornithine, thréonine, asparagine, sérine, tyrosine, proline, cystine, acide γ -aminobutyrique (GABA), et un composé non identifié détecté par UPLC-DAD : UK3.467. La feuille âgée de 96 jours est discriminée des deux précédentes par des concentrations plus élevées en succinate, asparagine et thréonine. Comme montré précédemment, l'augmentation des deux valeurs de coloration (les composantes rouge et verte), est associée au jaunissement de la feuille. Les teneurs en composés phytohormonaux varient de manière importante entre les différents stades développementaux (figure I-17). Les composés suivants ont pu être détectés aux trois stades de développement : l'IAN, l'IPR, le JA et l'OPDA, le PABA, le SA et la GA4. La teneur en GA4 augmente 2,16 fois entre le stade 68 et 96 jours. La teneur du PABA et du SA augmentent progressivement entre les trois stades mesurés pour atteindre 3 fois leur valeurs initiales. Les teneurs en IAA et en IPR augmentent de manière transitoire au stade intermédiaire puis diminuent au dernier stade. Les teneurs en JA et OPDA diminuent entre le stade intermédiaire et le dernier stade (respectivement de 1,5 à 0,6 et de 2 à 1,2 $\mu\text{mol.mg de MF}^{-1}$), et enfin la teneur en IAN diminue brusquement entre les deux premiers stades (de 3,3 à 0,5 $\mu\text{mol.mg de MF}^{-1}$).

Présumant que le développement de la feuille n'est pas homogène sur l'ensemble du limbe et que la progression de la sénescence puisse être dirigée selon **un axe longitudinal**, les analyses ont été réalisées à l'échelle de fractions du limbe foliaire prélevées selon cet axe. L'objectif est d'établir une cartographie métabolique du limbe foliaire et de mettre en avant un lien potentiel entre la distribution des métabolites et l'état de développement des tissus correspondants. Afin de vérifier cette hypothèse, une seconde analyse discriminante (PLS-DA) a été réalisée en regroupant les données en quatre groupes le long de l'axe basipète (figure I-18) : de la base vers le sommet de la feuille : 1-2-3 puis 4. L'axe factoriel représente 35,40 % de la variance des données et permet de séparer efficacement les fractions 1, 2 et 3, puis moins distinctement les fractions 3 et 4 (figure I-

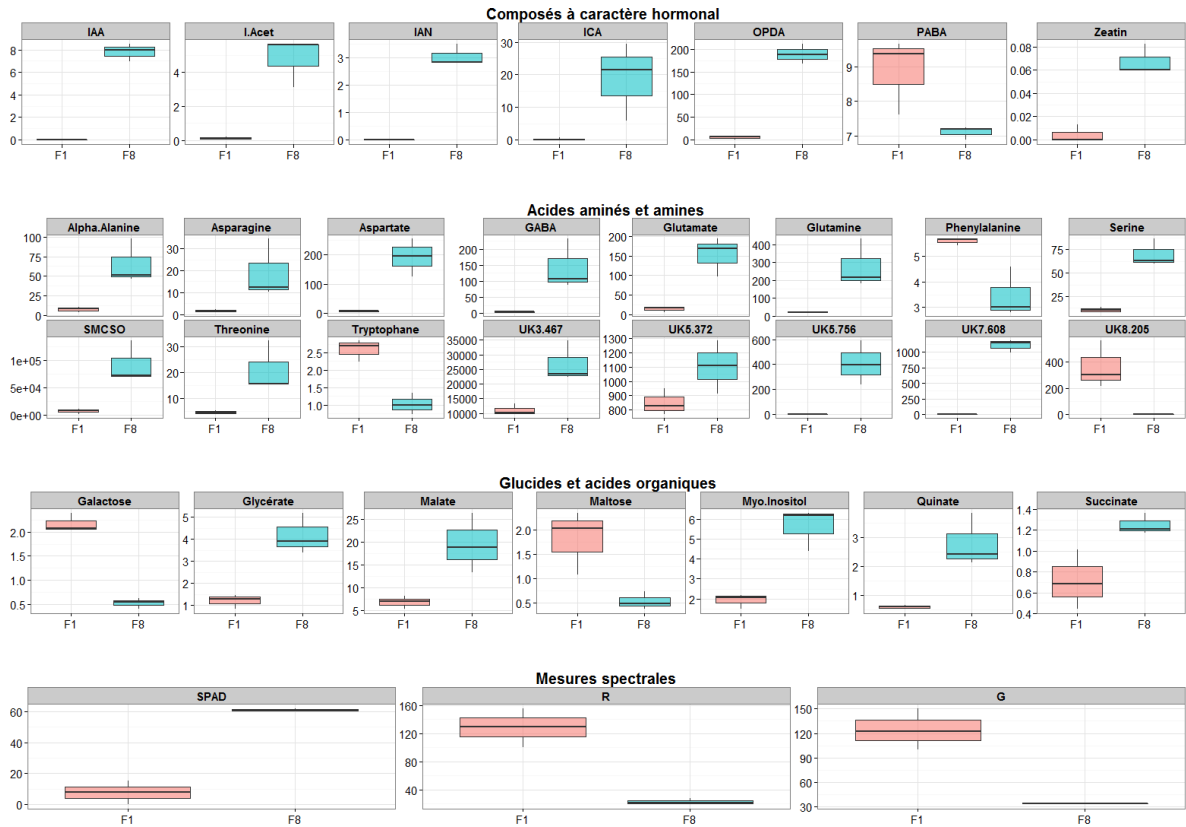


Figure I-15 : Distribution des concentrations mesurées pour les métabolites les plus discriminants entre une feuille sénescente (F1 en rouge) et une feuille en croissance (F8 en vert). L'ensemble des résultats présentés ci-dessus sont significativement différents entre les deux feuilles (p -value inférieure à 0,05 d'après le test de Kruskal-Wallis). Le SMCO ainsi que les métabolites qui n'ont pas été identifiés (préfixe UK) sont exprimés en Aire.g de MS^{-1} .

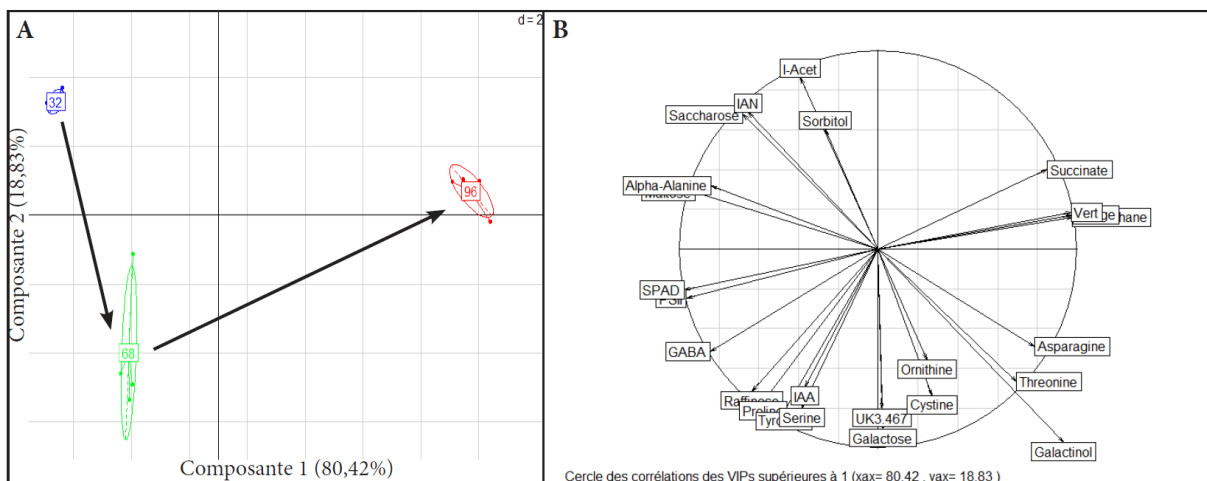


Figure I-16 : PLS-DA représentant la séparation des trois stades de développement d'une feuille de colza de rang 4 (32, 68 et 96 jours après le semis). Le plan factoriel (A) représente 99,25% de la variance des données obtenues à partir du profilage métabolique des glucides, acides organiques, acides aminés et composés à caractère phytohormonal, ainsi que de mesures spectrales (Chlorophylles par U. SPAD, rapport Fv/Fm, et composantes rouge, verte et bleue). Le cercle des corrélations (B) représente le poids des variables les plus discriminantes (VIPs) sur ce plan factoriel.

18A). Les quatre groupes sont bien séparés selon leur ordre de positionnement sur les feuilles avec la fraction basale en haut à droite du repère, et la fraction apicale à gauche. Il y aurait donc bien une discrimination métabolique derrière l'hypothèse de progression de la sénescence selon l'axe basipète.

Afin d'apprécier cette distribution des métabolites le long de l'axe longitudinal, les données brutes ont été représentées en distinguant bien les fractions de limbe pour les trois stades de développement (figure I-19). La teneur d'un certain nombre de métabolites varie le long de l'axe basipète. C'est le cas d'acides aminés comme l'alpha-alanine, l'arginine, l'asparagine, la β -alanine, la cystéine, le GABA, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phenylalanine, la proline, la serine, le S-méthyl-L-cytéine sulphoxide (SMCSO), la tyrosine, la valine, et de presque tous les glucides et acides organiques excepté le malate, le maltose et le quinate.

Les données ont ensuite été représentées par une carte de chaleur et regroupées en fonction de leurs profils au cours des trois stades de développement (figure I-20). Cette représentation permet de constater que la majorité des variations quantitatives se produit entre 68 et 96 jours, donc entre un stade intermédiaire et la fin de la sénescence. Mais certains métabolites varient plus précocement ; c'est par exemple le cas de l'asparagine, la cystéine, la proline, la thréonine, la tyrosine, le galactose et le raffinose.

Enfin, l'analyse comparée des profils métaboliques (acides aminés et sucres) entre les tissus de limbe, de nervure centrale et d'exsudat phloémien d'une même feuille en phase de sénescence a été entreprise. Elle avait pour ambition, sur un **axe** qualifié de **transversal**, d'apprécier, pendant une phase de remobilisation métabolique intense, la qualité des produits véritablement exportés *via* le phloème au regard de la représentation des ces mêmes produits dans les tissus du mésophylle (sources) et les tissus conducteurs (de transition). Le processus de récolte des exsudats étant toujours difficile à maîtriser et dans la mesure on nous souhaitions savoir si le processus d'exsudation pouvait s'avérer homogène ou à l'inverse hétérogène au cours du temps, des récoltes d'exsudats ont été réalisées après 1, 2, 4 et 6 heures de prélèvement. L'approche comparée des trois compartiments (limbe, nervure centrale, phloème) a été conduite seulement à 6 heures. Si l'on considère, dans un premier temps, la qualité de la sève phloémienne en fonction de la durée d'exsudation (figure I-21A), il apparaît, qu'en valeur relative des composés analysés, la qualité du phloème évolue assez peu avec le temps de prélèvement. Cependant, les représentations du glucose et du saccharose augmentent tout comme celles du glutamate et de la glutamine alors que les compositions relatives de la phénylalanine,

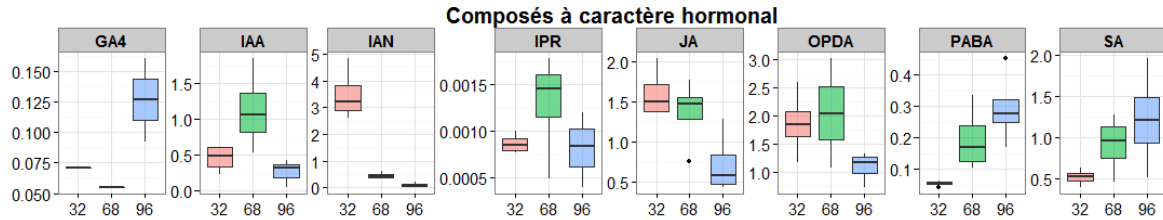


Figure I-17 : Teneurs en composés à caractère hormonal aux trois stades de développement étudiés (n=4).

GA4 : Giberelline A4, **IAA :** Acide indole 3-acétique, **IAN :** Indol 3-acétonitrile, **IPR :** N6-Isopentenyladenosine, **JA :** Acide jasmonique, **OPDA :** Acide 12-oxo-phytodiénoïque, **PABA :** Acide 4-aminobenzoïque, **SA :** Acide salicylique.

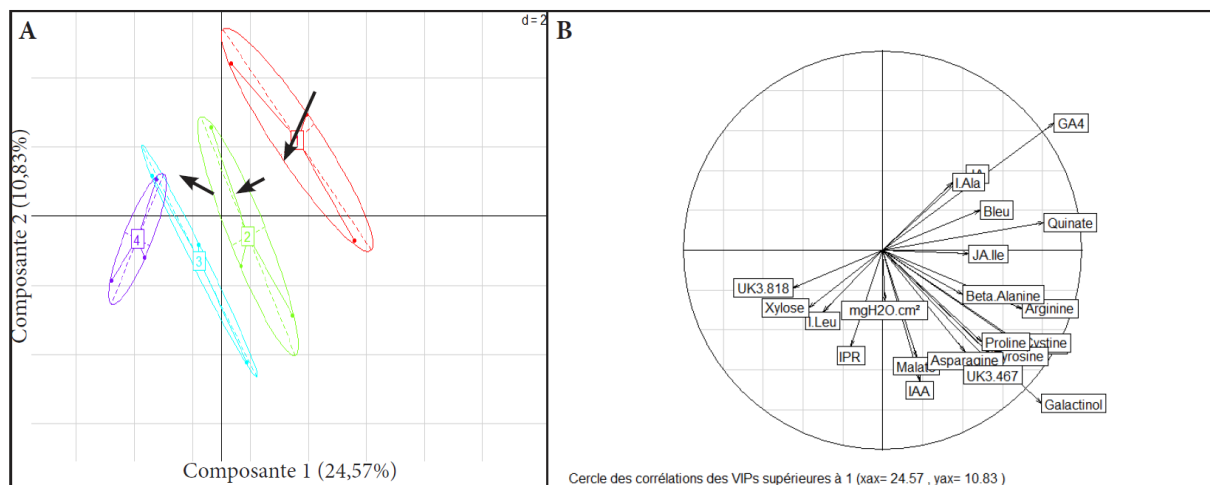


Figure I-18 : PLS-DA représentant 35,4% de la variance des données obtenues à partir du profilage métabolique des glucides, acides organiques, acides aminés et composés à caractère phytohormonal, ainsi que de mesures spectrales (Chlorophylles par U. SPAD, rapport Fv/Fm, et composantes rouge, verte et bleue). Il permet de séparer distinctement les 4 fractions du limbes d'une feuille de colza le long de l'axe basipète (A). Les flèches indiquent la progression de la base vers le sommet des feuilles. Le cercle des corrélations (B) représente le poids des variables les plus discriminantes (VIPs) sur ce plan factoriel.

de la proline et de l'arginine diminuent. Globalement, la qualité de la sève, sur le pas de temps considéré, paraît relativement stable. Les variations qualitatives, observées au même temps de prélèvement, dans la composition en acides aminés libres et en sucres non structuraux des tissus de limbe, de nervure centrale et d'exsudat phloémien sont nettement plus remarquables (figure I-21B). Les tissus de la nervure centrale sont beaucoup plus concentrés en glucose (60 % du total) par rapport à ceux du mésophylle (20 %) et du phloème (10 %). La proportion de saccharose va croissante depuis les tissus du limbe (1,7 %) vers le phloème (6 %) en passant par la nervure centrale (4,3 %). A l'inverse, dans la nervure centrale, la représentation du fructose, de l'aspartate, du glutamate, de la glutamine, de la sérine et du SMCSO diminue en comparaison aux tissus du mésophylle. A l'exception du saccharose, la proportion de tous ces métabolites est enrichie dans la sève par rapport à celle enregistrée dans les tissus de la nervure centrale (figure I-21B).

3.3. Discussion

Il s'agissait dans un premier temps d'acquérir des informations spatialisées de la progression de la sénescence, et de les utiliser pour en décrire le profil métabolique. La dynamique de développement des plantes a été évaluée par des mesures de croissance foliaire (aire, longueur et largeur), et la dynamique de progression de la sénescence a été évaluée à partir de mesures spectrales liées aux teneurs en chlorophylles, à l'efficacité des photosystèmes II (Fv/Fm) et aux composantes de colorations rouge, verte, bleu issues de photographies numériques. Ainsi, la dynamique de sénescence est caractérisée par la chute progressive de la teneur en chlorophylles dans les feuilles au cours du temps et par celle du rapport Fv/Fm qui diminue beaucoup plus tardivement comme décrit par Albert *et al.* (2012), et délimite ainsi la fin de la sénescence. Les mesures de coloration par analyse d'image ont permis de montrer que l'apparition des symptômes visibles sur les feuilles (leur jaunissement) est directement suivie par cette chute du rapport Fv/Fm (également décrit par Wingler *et al.*, 2004 chez *A. thaliana*). Ces mesures permettent de décrire la progression de la sénescence foliaire du colza en trois phases : (1) une phase de pré-sénescence qui débute avant la fin de croissance des feuilles et caractérisée par une diminution progressive de la teneur en chlorophylles, (2) la phase de sénescence caractérisée par une diminution constante de la teneur en chlorophylle et un maintien relatif de l'efficacité des PSII, (3) une phase de sénescence avancée, caractérisée par une

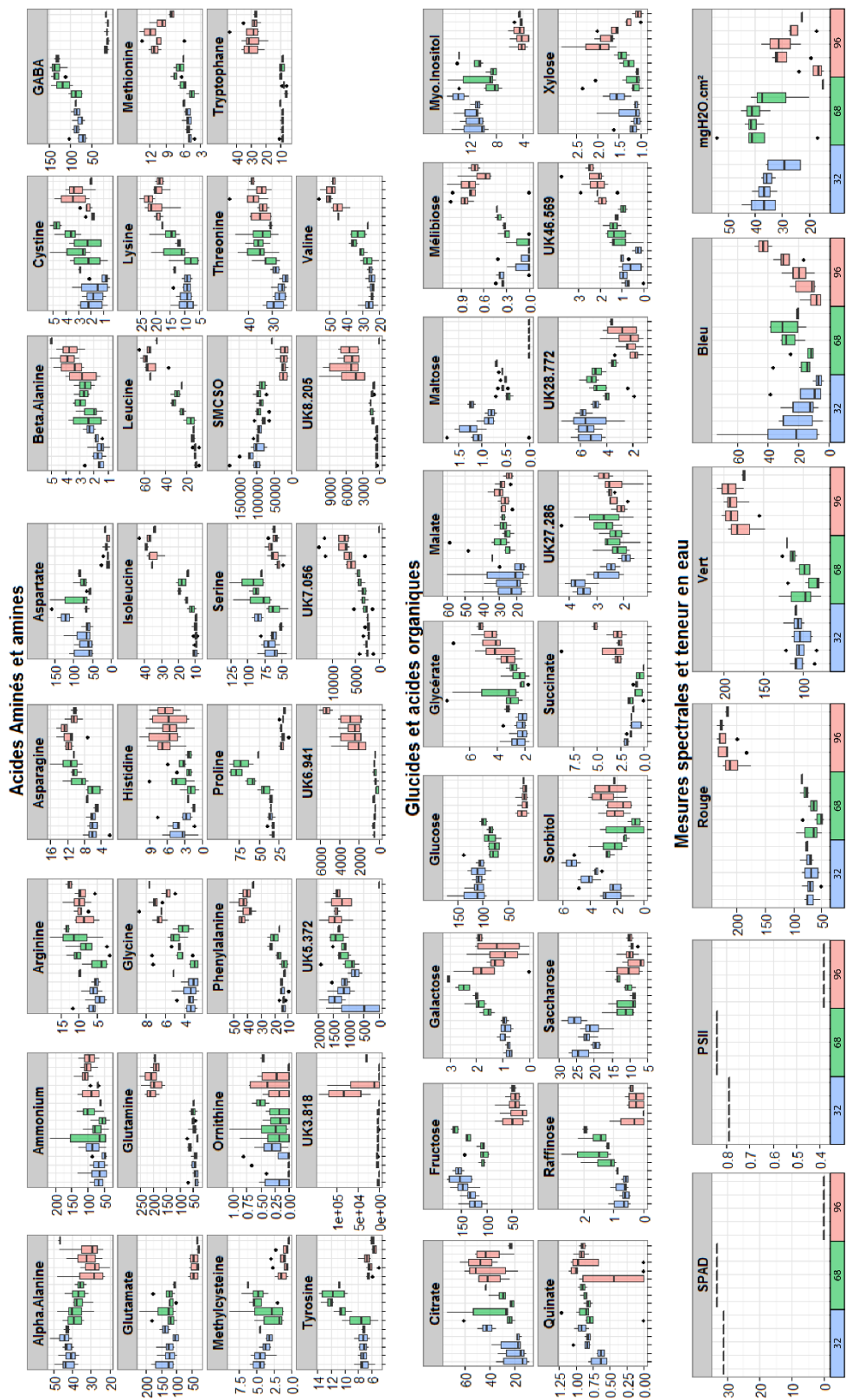


Figure I-19 : Teneurs en métabolites et mesures spectrales à trois stades de développement d'une feuille de colza : 32 (en bleu), 68 (en vert) et 96 (en rouge) jours après le semis. Il y a cinq jeux de données pour chaque stade qui correspondent aux valeurs mesurées le long de l'axe basipète, de la base (à gauche) vers le sommet (à droite) de la feuille. Le SMCO ainsi que les métabolites qui n'ont pas été identifiés (préfixe UK) sont exprimés en Aire.g MS⁻¹.

diminution accrue de la teneur en chlorophylles et par une chute brutale de l'efficacité des PSII. Cette dernière phase débute lors de l'apparition des symptômes visibles de la sénescence qui se traduisent par une augmentation des composantes colorimétriques rouge et verte. Guiboileau *et al.* (2010) décrivent le développement des feuilles en trois phases : une phase d'expansion, suivi par une phase de maturité et qui se termine par la phase de sénescence. Chez le colza, la phase de maturité durant laquelle les feuilles acquièrent leur capacité à entrer en sénescence, serait très courte ou confondue avec la phase d'expansion. En effet, dans nos conditions expérimentales, la diminution de la teneur en chlorophylles débute quelques jours avant la fin de la phase d'expansion. Chez certaines dicotylédones, la transition puits-sources commence au sommet des feuilles alors qu'elles n'ont atteint que 30 à 60 % de leur taille finale (d'après Watanabe *et al.*, 2013) ce qui peut expliquer ce chevauchement des phases d'expansion et de maturité.

Le long de l'axe vertical de la plante, il y a une augmentation progressive de la vitesse de croissance des feuilles vers les étages supérieures, couplée à une augmentation de la surface foliaire jusqu'au rang 4 dans nos conditions expérimentales. Les rangs foliaires suivants sont plus homogènes en termes de surface, mais sont caractérisés par un allongement de la phase de sénescence qui se traduit par une diminution plus lente de la teneur en chlorophylles. Cette observation est potentiellement liée au statut nutritionnel et environnemental (éclairage, ombrage) de la plante et à l'augmentation progressive de la surface photosynthétique au cours de son développement. C'est sur la base de ces observations que l'échantillonnage des feuilles a été déterminé pour réaliser une approche métabolique visant à identifier les métabolites régulateurs et effecteurs des processus de remobilisation de l'azote et du carbone au cours du vieillissement foliaire. Les profilages métaboliques ont tout d'abord été réalisés sur deux rangs foliaires d'âge très différencié puis sur un même étage foliaire à trois stades développementaux : un stade précoce (32 jours après le semis), un stade intermédiaire (68 jours après le semis) et un stade tardif (96 jours après le semis).

Les profils métaboliques obtenus à partir des trois stades développementaux sont cohérents avec ceux obtenus à partir du profilage des deux rangs foliaires très différenciés (rang 1 et rang 8), sauf pour certains métabolites, comme l'IAA et les acides organiques, dont la teneur est beaucoup plus importante dans les jeunes feuilles en croissance. Ces différences sont principalement dues au positionnement de la feuille par rapport au méristème apicale, et à leur statut développemental. L'échantillonnage utilisé ne permet donc pas de dissocier les facteurs confondants propres à la sénescence et à la position de

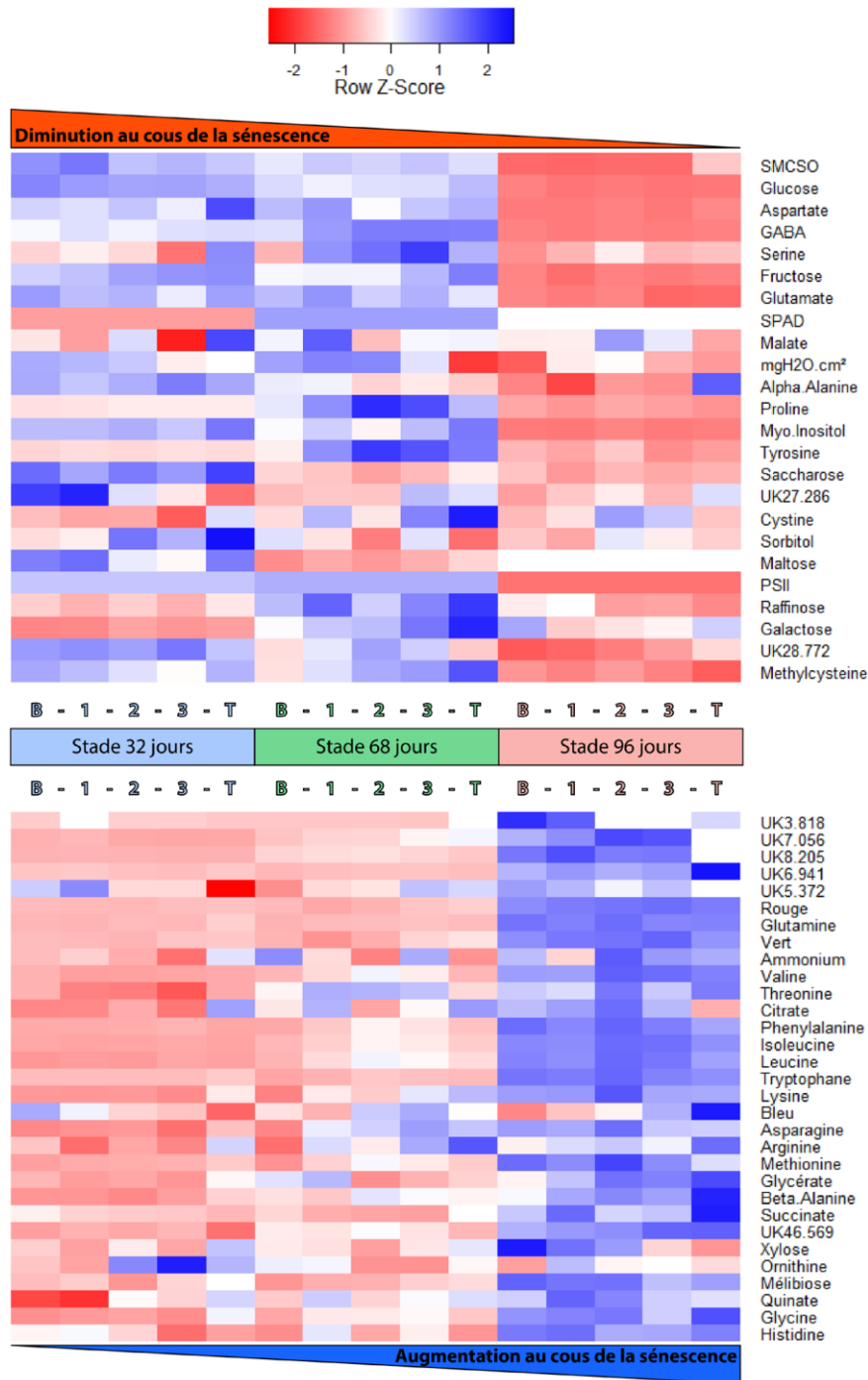


Figure I-20 : Teneurs en métabolites et mesures spectrales représentées sous la forme d'une carte de chaleur normalisée pour chaque ligne. Les variables qui diminuent au cours des trois stades de développement sont rassemblées dans la partie supérieure, et celles qui augmentent dans la partie inférieure. Pour chacun des stades, la feuille a été découpée en 5 parties le long de l'axe basipète représenté de la base vers le sommet de la feuille : B - 1 - 2 - 3 - T.

la feuille le long de l'axe vertical. L'analyse temporelle par contre permet d'observer des empreintes particulièrement claires de l'évolution spatio-temporelle du vieillissement foliaire. Chaque étape peut donner lieu à la définition de signatures et la révélation de marqueurs métaboliques spécifiques appartenant aussi bien aux métabolismes azotés et glucidiques qu'au métabolisme phytohormonal. L'approche analytique est suffisamment affinée pour révéler le caractère basipète de la sénescence et offrir la possibilité de révéler plus distinctement les réseaux métaboliques et les éléments de régulation associés aux statuts puits ou sources des organes et aux phénomènes d'allocations et de répartitions du carbone et de l'azote.

Les acides aminés libres jouent un rôle important comme vecteur de carbone et d'azote au sein de la plante. Ils sont principalement issus de la dégradation des protéines au cours de la sénescence foliaire, et notamment à partir des chloroplastes qui constituent la principale source de nutriments azotés dans les tissus foliaires (d'après Martínez *et al.*, 2008). L'asparagine et la glutamine sont des formes privilégiées remobilisables à longue distance de l'azote et du carbone (Urquhart and Joy, 1981) et sont les deux composés dont les teneurs varient le plus fortement au cours de la progression de la sénescence observée ici. L'augmentation de l'interconversion de l'aspartate en asparagine et du glutamate en glutamine pourrait être traduite par l'élévation mesurée des rapports asparagine/aspartate et glutamine/glutamate entre le début et la fin de la sénescence (respectivement de 0,07 à 0,98 et de 0,34 à 5,022). La diminution de la concentration absolue d'aspartate et d'asparagine confirmerait leur implication dans la remobilisation de l'azote. Ces tendances sont retrouvées chez *A. thaliana* (Watanabe *et al.*, 2013). Chez le colza, la remobilisation de la glutamine pourrait intervenir plus tardivement dans le processus de recyclage ou bien être en partie responsable de la teneur résiduelle en azote que l'on retrouve dans les feuilles détachées.

Parmi les acides aminés dont la teneur augmente au cours de la sénescence, sont retrouvés les acides aminés à chaîne latérale ramifiée (isoleucine, valine et leucine) dont l'augmentation est très fortement corrélée ($R^2 = 0,99$ pour les trois avec une p -value $< 0,001$), deux des trois acides aminés aromatiques (phenylalanine et tryptophane) ainsi que la lysine. Ces acides aminés pourraient servir à maintenir une activité de respiration alternative au niveau des mitochondries (Araújo *et al.*, 2011) afin de produire l'énergie nécessaire aux cellules alors que le glucose diminue de manière drastique pendant la sénescence. Ces profils sont également retrouvés chez *A. thaliana* (Watanabe *et al.*, 2013). Certains acides aminés sont souvent décrits comme métabolites de stress comme la

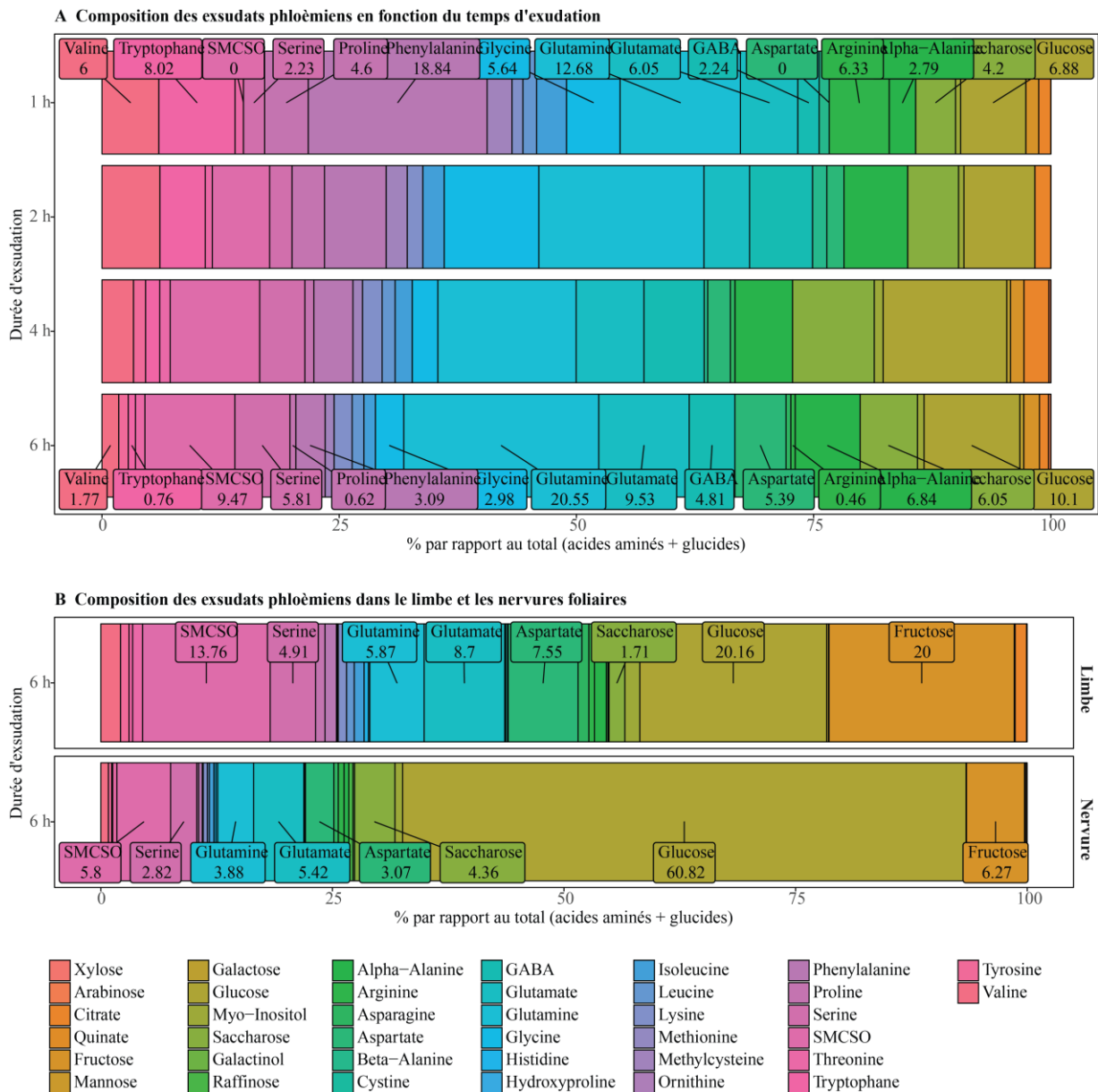


Figure I-21 : Teneurs en métabolites et mesures spectrales représentées sous la forme d'une carte de chaleur normalisée pour chaque ligne. Les variables qui diminuent au cours des trois stades de développement sont rassemblées dans la partie supérieure, et celles qui augmentent dans la partie inférieure. Pour chacun des stades, la feuille a été découpée en 5 parties le long de l'axe basipète représenté de la base vers le sommet de la feuille : B - 1 - 2 - 3 - T.

proline, la b-alanine ou le GABA (Obata and Fernie, 2012). La teneur en α -alanine augmente légèrement dans les feuilles en sénescence (de 1,6 à 3,8 $\mu\text{mol.gMS}^{-1}$), alors que les teneurs en GABA et en proline augmentent à un stade intermédiaire, plus particulièrement au sommet du limbe foliaire, puis diminuent ensuite très fortement en fin de sénescence. Si ces métabolismes pourraient effectivement protéger les cellules au cours de la sénescence, ils ne seraient pas responsables du reliquat d'azote organique en fin de sénescence et pourraient au contraire traduire l'efficacité du processus de recyclage. L'azote organique résiduel immobilisé dans des acides aminés libres est retrouvé majoritairement sous la forme de glutamine, isoleucine, leucine, lysine, phénylalanine, valine et tryptophane.

Les glucides solubles non structuraux, originaires des polyglycanes ou des processus de néoglucogenèse jouent un rôle crucial dans le métabolisme énergétique des tissus sénescents, mais sont également susceptibles d'exercer des rôles régulateurs bien que ces derniers soient controversés dans la mesure où leur accumulation comme leur carence induisent la sénescence (Wingler *et al.*, 2009). Sur les 10 glucides détectés par GC-FID, seules les teneurs en mélibiose et en galactose augmentent au cours de la sénescence, avec une accumulation plus importante au sommet des feuilles. La teneur absolue en glucides totaux diminue cependant de manière drastique au cours de la sénescence (d'environ 300 $\mu\text{mol.g MF}^{-1}$ au premier stade, à 80 $\mu\text{mol.g MF}^{-1}$ au dernier stade), ce qui implique des mécanismes de transports ou de mobilisation métabolique efficaces chez le colza. Le fructose et le glucose sont les principaux glucides présents au premier stade développemental étudié (respectivement 140 et 115 $\mu\text{mol.g MF}^{-1}$). Ils seraient principalement issus de la dégradation du saccharose et pourraient être impliqués dans le déclenchement de la sénescence comme c'est le cas chez *A. thaliana* (Pourtau *et al.*, 2006). Le saccharose qui est la forme principale de transport du carbone à longue distance (Lemoine *et al.*, 2013) diminue fortement entre le premier stade de développement et le stade intermédiaire, puis reste représenté à faible concentration jusqu'au stade ultime de sénescence. Les teneurs du myo-inositol et du raffinose diminuent également de manière régulière et synchrone au cours de la sénescence selon un gradient acropète. Qu'ils soient néo-synthétisés ou issus de processus dégradatifs, leur contribution à des fonctions de recyclage mérite d'être sérieusement envisagée. Ces deux composants glucidiques peuvent faire l'objet d'un transport phloémien qu'il conviendrait d'analyser plus finement ici (Turgeon and Medville, 2004).

Contrairement à ce qui est décrit chez *A. thaliana* (Watanabe *et al.*, 2013), les teneurs en acides organiques intermédiaires du cycle de Krebs (citrates, malates, succinates) ne semblent pas perturbées de manière importante au cours de la sénescence foliaire du colza. Néanmoins, les teneurs en glycérate et succinate sont plus importantes au sommet des feuilles durant le dernier stade, et suivent un gradient acropète. Cette observation appuie l'hypothèse d'un contrôle spatial de la production d'énergie au niveau des différents tissus et d'un maintien de cette production au cours de la progression de la sénescence. Sur le plan hormonal, la régulation de la sénescence foliaire est décrite en trois étapes dans la littérature : (1) une étape d'initiation qui se traduit par une diminution de la teneur et de la sensibilité aux hormones retardant la sénescence (CK, IAA et GA), (2) une étape d'induction de la sénescence dépendante de l'éthylène qui se traduit par une augmentation de la teneur et de la sensibilité aux hormones induisant la sénescence (éthylène, ABA, JA et dérivés et SA) et enfin (3) une étape de vieillissement avancé indépendante de l'éthylène qui n'est plus réversible (d'après Guiboileau *et al.*, 2010). L'éthylène est considérée comme une hormone clé du déclenchement de la sénescence foliaire, mais de par sa nature volatile et des procédures particulières de son analyse, elle n'a pas été dosée ici. Seules les teneurs en IAA et un de ses précurseur l'IAN, en IPR, en JA et son précurseur : l'OPDA, un précurseur des folates : le PABA, le SA et la GA4 ont été analysées. Nos résultats montrent une augmentation de la teneur en GA4 et SA au cours de la sénescence, une diminution d'IAN, JA et OPDA ainsi qu'une augmentation transitoire d'IAA et d'IPR.

La diminution de l'IAN entre la première et la deuxième phase de la sénescence semble corrélée avec l'augmentation transitoire d'IAA. Chez *A. thaliana*, la transcription de 3 gènes codant des nitrilases (AtNIT1 à 3) responsables de la conversion de l'IAN en IAA est activée au cours de la sénescence (Graaff *et al.*, 2006). Le rôle de l'IAA au cours de la sénescence est complexe, d'un côté l'augmentation de sa teneur en début de sénescence semble être favorable à son déclenchement via notamment l'activation de SAUR36 chez *A. thaliana* (Hou *et al.*, 2013), alors que l'application d'IAA exogène ou l'augmentation de la sensibilité aux auxines entraînent un retard de la sénescence (d'après Khan *et al.*, 2014). Cette augmentation transitoire de l'IAA semble donc favorable au déclenchement de la sénescence chez le colza, mais les mécanismes précis restent à déterminer.

Le GA4 est une forme active des GAs qui sont des hormones décrites comme retardant la sénescence, les gènes impliqués dans leur synthèse étant généralement réprimés, alors que ceux impliqués dans leur dégradation seraient induits (d'après Graaff *et al.*, 2006).

L'augmentation de GA4 chez le colza est donc surprenante, néanmoins il semble que le rôle des GAs au cours de la sénescence soit encore mal compris. En effet chez *A. thaliana*, un gène positivement régulé par l'application exogène de GAs (AtMERI5) est naturellement induit au cours de la sénescence (d'après Graaff *et al.*, 2006). L'élément induisant son expression n'a pas encore été identifié, mais la teneur élevée en GA4 observée chez le colza en fin de sénescence peut constituer une piste à explorer.

L'IPR et la Z sont des précurseurs des cytokinines actives (CKs) décrites comme retardant le jaunissement des feuilles et la dégradation des chlorophylles chez plusieurs espèces végétales, et la diminution de la teneur absolue en CKs est nécessaire au déclenchement de la sénescence (d'après Khan *et al.*, 2014). Chez le colza, la teneur en Z diminue fortement entre une feuille en croissance et une feuille sénescente. En revanche elle n'a pas pu être détectée aux différents stades intermédiaires analysés. La diminution de sa teneur doit donc être très précoce et antérieure au premier stade étudié (correspondant à une feuille de rang 4 âgée de 32 jours). L'IPR détectée à des teneurs très faibles (0,0012 $\mu\text{mol.mg}$ de MF-1) semble appuyer cette hypothèse. Il sera tout de même nécessaire de le confirmer en dosant la Z et l'IPR à des stades plus précoces de la sénescence.

Les teneurs en JA et en son précurseur l'OPDA sont décroissantes au cours de la sénescence, et sont bien inférieures par rapport à celles révélées dans une feuille en croissance. Le rôle des JA a été mis en évidence à partir de l'application exogène de Me-JA qui provoque la sénescence foliaire chez de nombreuses espèces (d'après Khan *et al.*, 2014). Le Me-JA étant très volatile, il n'a pu être dosé par la méthode analytique employé ici, néanmoins les approches par mutations de la voie des JAs pour vérifier leur rôle au cours de la sénescence naturelle des plantes n'ont pas permis de confirmer leur implication directe dans ces processus (d'après Khan *et al.*, 2014). La diminution observée du JA et de l'OPDA au cours de la sénescence pourrait être associée à leur mobilisation métabolique vers des formes plus actives comme le méthyl-jasmonate ou le jasmonate-isoleucine ou des formes glycosylées qu'il conviendra de rechercher par la suite.

Les teneurs en PABA et SA augmentent progressivement au cours de la sénescence du colza. Le SA est connu non seulement pour déclencher les réactions de défenses contre les pathogènes, mais également pour induire la sénescence foliaire, notamment en situation de faible luminosité (d'après Khan *et al.*, 2014). Il n'a pas pu être détecté dans les feuilles en croissance du haut du couvert végétal chez le colza, par contre il est détecté dans les feuilles en sénescence. Il pourrait donc être impliqué dans le déclenchement et/ou la progression de la sénescence au niveau des feuilles du bas du couvert végétal, dont

l'efficacité d'utilisation des radiations lumineuses est ralentie. Cette relation reste néanmoins à démontrer en dosant le SA au niveau de plusieurs rangs foliaires et dans différentes situations de luminosité.

Nous retiendrons de l'analyse comparée des acides aminés et des glucides dans les tissus du limbe foliaire, ceux de la nervure centrale et dans le phloème de la feuille correspondante (après 6 heures d'exsudation) que, considérée en proportion relative (en % du total), leur représentation fluctue singulièrement suivant la nature des tissus qui devraient constituer un continuum dans le processus de remobilisation. Étonnamment, les tissus de la nervure centrale sont particulièrement riches en glucose (plus de 60 % du total mesuré). Ils s'appauvrissent, à l'inverse, en sérine, SMCSO, glutamate, glutamine et aspartate par rapport aux tissus voisins du limbe foliaire. Si la comparaison est faite entre composition de la nervure centrale et des exsudats phloémiens, qui circulent par nature au sein de la nervure, des processus de sélectivité de chargement du phloème apparaissent. Les exsudats véhiculent, sur le plan de l'azote, essentiellement de la glutamine, du glutamate, de l'aspartate, de l'alanine et du GABA. La contribution du GABA, dont la production est stimulée pendant la sénescence (cf supra), au transfert d'azote et de carbone, retient l'attention. Le SMCSO est également très bien représenté dans la phloème comme vecteur de soufre qui pourrait s'avérer essentiel chez le colza. Sur le plan des sucres, saccharose et glucose sont les deux contributeurs principaux de la composition de la sève. Lohaus et Schwerdtfeger (2014) ont comparé la composition de la sève phloémienne à celle de l'ensemble des tissus foliaires et ont montré que le saccharose était enrichi dans la sève alors que glucose et fructose étaient majoritaires dans les tissus mésophylliens. Les travaux très récents de Clément *et al.* (2018) semblent montrer l'inverse via la comparaison des profils métaboliques de limbe et de nervure centrale où glucose, fructose et saccharose ont des concentrations voisines dans le limbe alors que les hexoses sont fortement enrichis dans la nervure centrale. Il est proposé que les fortes concentrations de glucose et de fructose pourraient jouer un rôle important dans le transfert des sucres depuis les organes sources vers les puits et pourraient contrôler l'allocation vers le phloème ou le xylème. Ces auteurs suggèrent que le suivi de la composition en métabolites dans la nervure centrale et dans le pétiole pourrait servir de « proxy » à l'évaluation de la composition de la sève. Notre étude précise que la composition du phloème n'est pas le reflet de la composition des tissus de la nervure centrale et que des ajustements métaboliques et des processus de sélectivité de transport opèrent qui contribuent notamment à enrichir le phloème en saccharose, en glutamine, en alanine, en GABA et en SMCSO. Une attention particulière doit être portée vers l'étude

moléculaire de la régulation de ces processus d'allocation sélective (via le métabolisme et le transport) qui doivent largement contribuer à déterminer l'efficacité des capacités de remobilisation du carbone, de l'azote et du soufre.

3.4. Matériels et Méthodes

3.4.1. Matériel végétal

Les graines de la variété Aviso ont été semées en mini mottes puis repiquées dans des pots de 2 L, 14 jours après la levée. Les plantes ont été cultivées en serre en lumière naturelle. Un dispositif de lampes d'appoints a été mis en place afin de maintenir un rayonnement minimal de $200 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pendant la phase éclairée (phase lumineuse de 16 h et phase sombre de 8 h). L'arrosage a été réalisé 2 à 3 fois par semaine avec une solution nutritive (Liquoplant Bleu de Plantin, France).

3.4.2. Méthodologies dédiées à l'approche physiologique

Afin d'apprécier macroscopiquement la dynamique de croissance et de progression de la sénescence des tissus foliaires, des mesures non-invasives ont été réalisées périodiquement. Les déterminations ont été effectuées en triplicata tous les trois jours pendant quatre-vingts jours après la levée. La croissance des feuilles a été appréciée par des mesures de longueur, de largeur et de surface foliaires. La coloration des feuilles a été évaluée par analyse d'images à partir de photographies numériques prises au format RAW. Afin de décomposer les composantes rouge, verte et bleue de l'image avec le logiciel d'analyse ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), il a été nécessaire de corriger la balance des blancs avec un fond étalonné. La teneur en chlorophylles a été mesurée à l'aide d'un chlorophylle-mètre à pince (SPAD-502 de Konica Minolta, Japon) le long de l'axe basipète sur une demi-feuille. Le paramètre F_v/F_m , représentatif de l'efficacité des photosystèmes II, a été mesuré à l'aide d'un spectrofluorimètre (Handy PEA de Hansatech Instruments, Londres) en trois points sur chacun des limbes foliaires.

3.4.3. Plan de prélèvement des tissus foliaires

La progression métabolique de la sénescence a été appréciée selon quatre axes spatio-temporels définis comme suit : **l'axe vertical** (les différents étages foliaires à un même stade de développement de la plante), **l'axe horizontal** (les différents stades de développement de la feuille à un même étage foliaire), **l'axe longitudinal** (les différentes

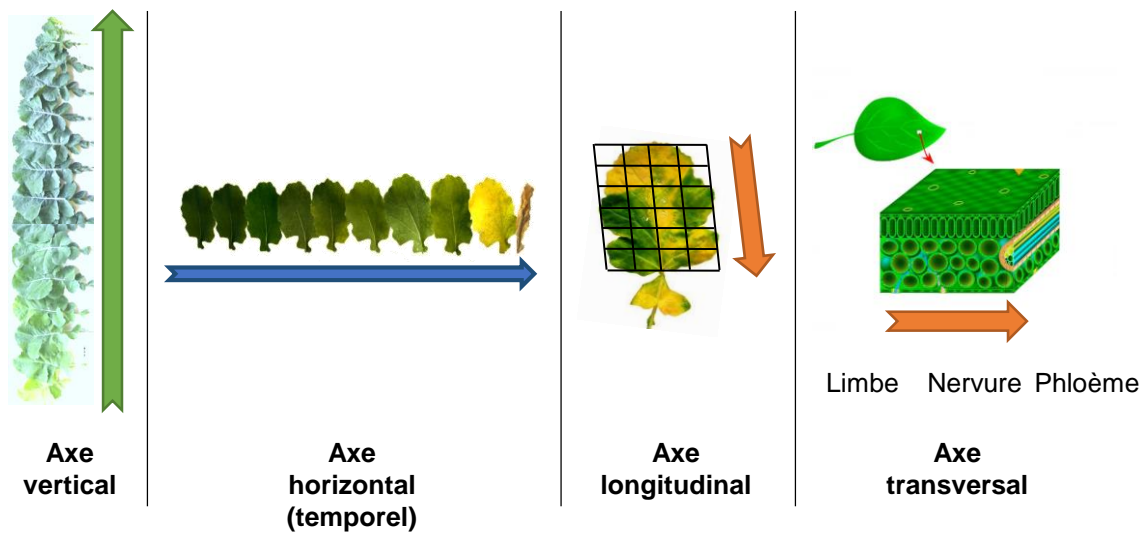


Figure I-22 : Représentation des trois axes spatio-temporels définis pour l'étude de la progression de la sénescence foliaire. L'axe vertical correspond aux différents étages foliaires d'âge différent chez le colza (à gauche). L'axe horizontal correspond à la progression de la sénescence au cours du temps sur un même étage foliaire (au milieu). L'axe longitudinal correspond à la progression de la sénescence au niveau du limbe d'une même feuille (à droite). L'axe transversal correspond au *continuum* limbe/nervure/phloème.

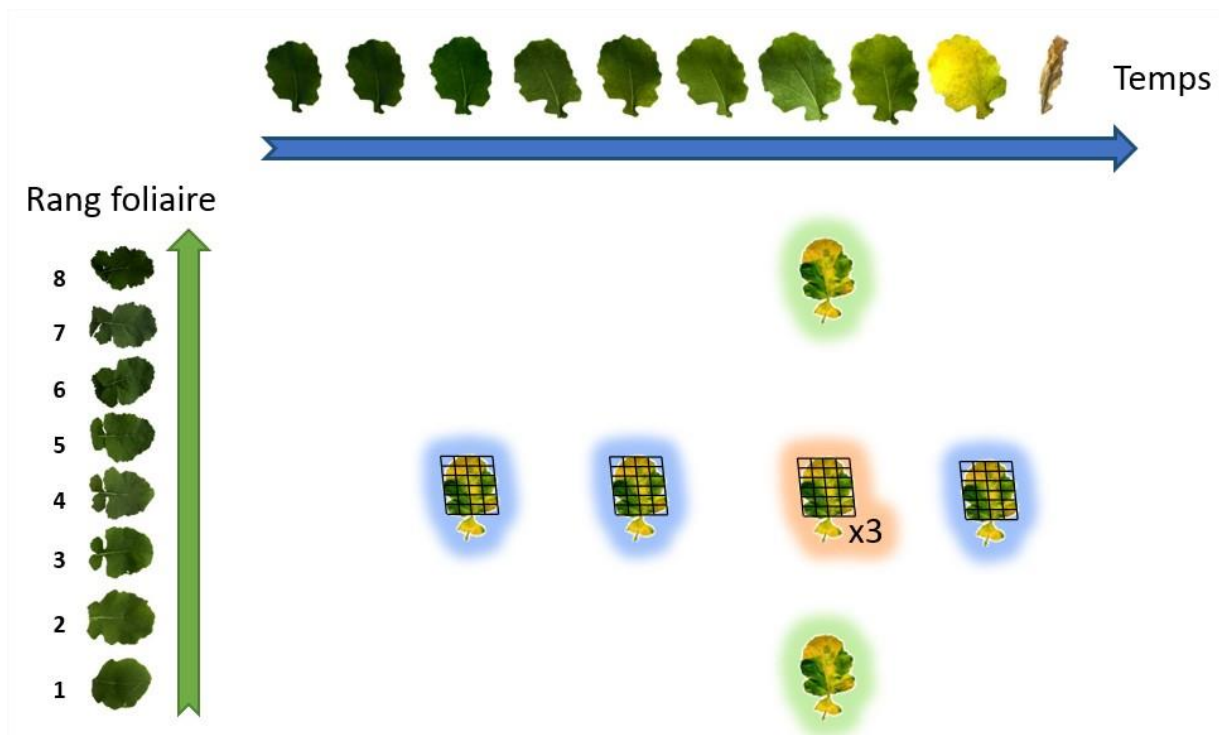


Figure I-23 : Représentation du plan des prélèvements réalisés au cours de l'étude. La sénescence a été appréhendée dans un premier temps selon l'axe vertical entre deux feuilles de rangs foliaires éloignées (en vert). Puis la variabilité biologique à l'échelle de fractions de limbes a été estimée (en orange). Enfin la dynamique de progression de la sénescence sur la feuille de rang 4 a été appréciée en réalisant trois séries de prélèvements tout au long du développement de la feuille (en bleu).

zones le long du continuum pétiole-apex du limbe foliaire) et **l'axe transversal** (le continuum limbe-nervure centrale-sève phloémienne pour une même feuille) (figure I-22).

Afin d'obtenir des profils métaboliques qui serviront de références d'états très différenciés de la progression de la sénescence, des analyses ont été réalisées dans un premier temps à partir de deux feuilles entières d'âges très contrastés : une feuille en croissance de rang 8 et une feuille sénescente de rang 2 (en vert sur la figure I-23). Les prélèvements ont été réalisés à partir de trois plantes âgées de 67 jours. Dans un deuxième temps, la répétabilité biologique des analyses à l'échelle de fractions de limbes a été estimée en réalisant trois séries de prélèvements (trois plantes) sur une feuille de rang 4 âgée de 89 jours (en rouge sur la figure I-23). La dynamique de progression de la sénescence à l'échelle d'une feuille a été appréciée en réalisant trois points de prélèvements sur une période de 64 jours. Les feuilles de rang 4 ont été prélevées à partir de trois plantes âgées respectivement de 32, 68 et 96 jours (en bleu sur la figure I-23). Enfin, le profilage métabolique comparé, à un stade de développement foliaire avancé, des tissus de limbe, de la nervure centrale et des exsudats phoémiens a été réalisé sur des feuilles de rang 4 récoltées après 96 jours de culture.

3.4.4. Méthodes de prélèvement

Sur feuille entière : Les feuilles ont été pesées et congelées dans l'azote liquide immédiatement après leur prélèvement. Les tissus ont été broyés à l'aide d'un broyeur à billes (TissueLyser II de Qiagen, Pays-Bas) pendant 20 secondes à 30 Hz. Le broyat a ensuite été réparti de la manière suivante : 400 mg de matière fraîche (MF) ont été utilisés pour l'extraction des phytohormones, et 100 mg de MF ont été lyophilisés puis pesés afin de calculer la teneur en eau dans les échantillons puis stockés à -80 °C en attendant l'extraction pour l'analyse des métabolites.

Fractionnement du limbe foliaire : L'évaluation métabolique de la progression longitudinale de la sénescence a nécessité de réaliser un zonage du limbe foliaire. Les feuilles ont été découpées de part et d'autre de la nervure centrale en utilisant un patron en plastique de 2,5 x 2,5 cm (en vert sur la figure I-24). Les tissus ont été pesés puis congelés dans l'azote liquide avant d'être broyés au broyeur à billes à 30 Hz pendant 20 secondes. Pour chacune des parcelles, 100 mg de MF ont été lyophilisés, pesés et stockés à -80 °C pour l'extraction des glucides, acides aminés et acides organiques. Les broyats restants ont été rassemblés dans quatre tubes de 2 mL selon l'axe horizontal (en bleu sur

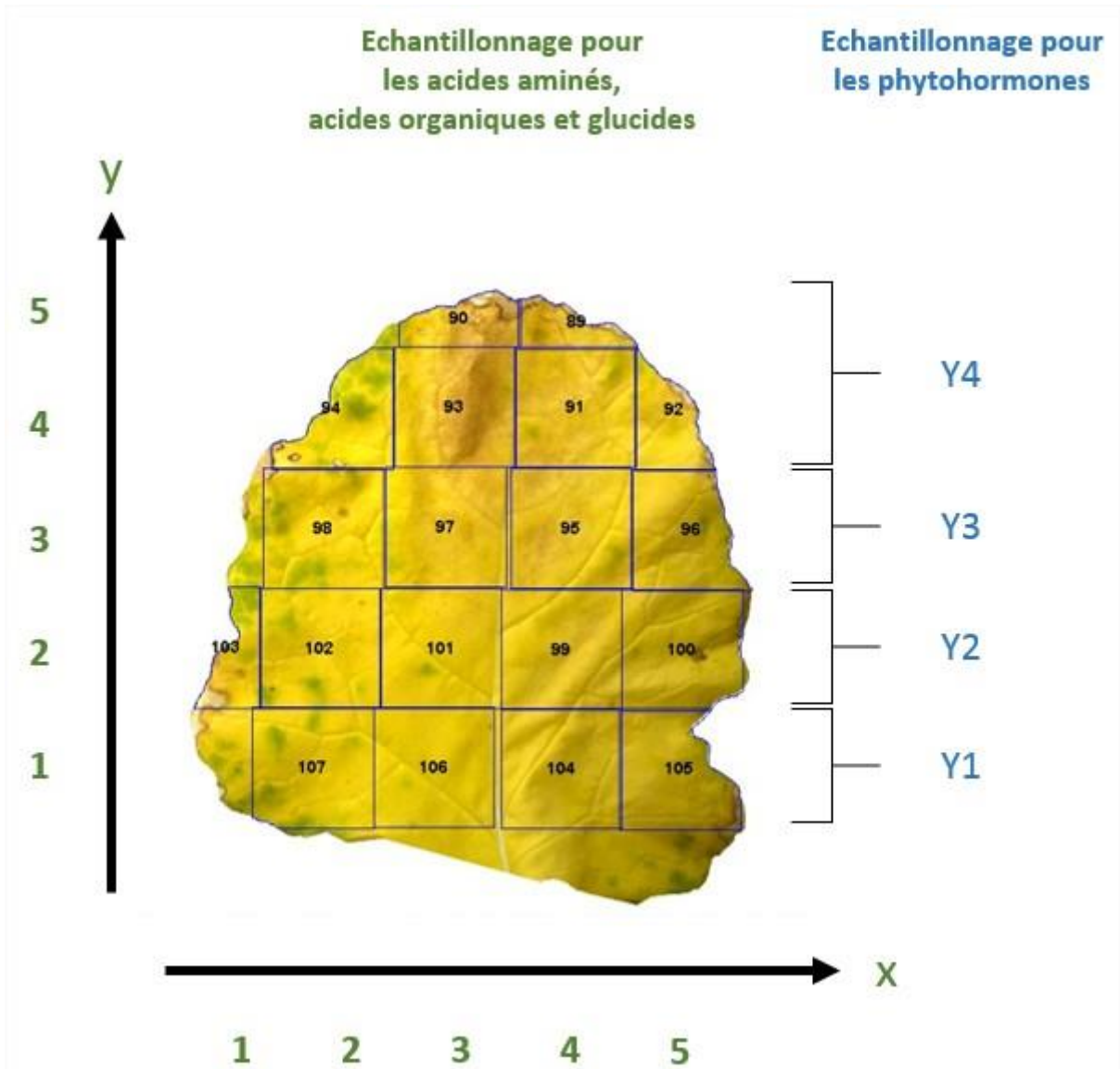


Figure I-24 : Plan d'échantillonnage pour l'analyse des acides aminés, des acides organiques et des glucides (en vert) et pour l'analyse des phytohormones (en bleu) à l'échelle de fractions de limbe foliaire.

la [figure I-23](#)), sauf pour les deux lignes apicales qui ont été rassemblées afin d'obtenir 200 mg de MF, quantité nécessaire à la détermination quantitative des phytohormones.

Prélèvement des exsudats phloémiens : L'analyse métabolique comparative du profil du limbe foliaire, de la nervure centrale et de l'exsudat phloémien a été entrepris sur le même rang foliaire (rang 4 de plantes âgées de 96 jours). La sève phloémienne a été collectée selon les procédures décrites en « Matériel et Méthodes ». Une analyse de la cinétique d'exsudation a consisté à faire des prélèvements de sève pendant 1, 2, 4 et 6 heures. Après 6 heures, la feuille est découpée en 2 demi-limbes et la nervure centrale est isolée. Les tissus sont pesés, congelés, broyés puis lyophilisés avant analyse. Quatre répétitions ont été réalisées.

3.4.5. Extraction, analyse et quantification des métabolites primaires et des phytohormones

Seules des métabolites dits primaires et plus particulièrement les acides aminés, les glucides solubles et quelques acides organiques ainsi que des phytohormones ont été considérés ici. Se référer aux méthodologies décrites dans la partie générale « Matériels et Méthodes » pour disposer des informations techniques complètes.

3.4.6. Analyses statistiques

L'ensemble des étapes de traitement des données ainsi que les analyses statistiques ont été réalisés avec le logiciel de statistique R version 3.1.0 (<http://www.r-project.org>) sous l'environnement RStudio version 0.98.501 (<https://www.rstudio.com>). Les « packages » additionnels suivants ont servi à réaliser la mise en forme des données (`reshape2` et `plyr`), les tests statistiques de Kruskal-Wallis (`stats`), les graphiques multiples (`ggplot2` et `gridExtra`), les analyses en composantes principales (`ade4` et `missMDA`), les analyses discriminantes par régression linéaire des moindres carrés partiels (`mixOmics`) et enfin le calcul des scores associés aux variables importantes dans la projection (`RVAideMemoire`).

CHAPITRE 2

ORIENTATION MÉTABOLIQUE DE LA PROLINE PENDANT LA SÉNESCENCE FOLIAIRE AU COURS DU DÉVELOPPEMENT VÉGÉTATIF DU COLZA D'HIVER

1. Introduction

2. Senescence-induced proline catabolism as a source of substrates and energy for nutrient recycling processes in oilseed rape leaves (Article)

CHAPITRE 2 : ORIENTATION MÉTABOLIQUE DE LA PROLINE PENDANT LA SÉNESCENCE FOLIAIRE AU COURS DU DÉVELOPPEMENT VÉGÉTATIF DU COLZA D'HIVER

1. Introduction

Les informations rassemblées dans le chapitre précédent précisent que, par nature, le métabolisme des acides aminés est fortement mobilisé au cours du développement foliaire et engagé dans les processus de ré-allocation métabolique et nutritionnelle qui concourent notamment au recyclage des protéines pendant la sénescence. Parmi tous ces acides aminés, l'un d'entre-eux retient plus particulièrement notre attention, eu égard les très nombreux travaux qu'il a suscité, chez le colza, dans un autre contexte biologique, qui est celui de la réactivité métabolique de la plante aux stress abiotiques. L'acide aminé en question est la proline. Un faisceau d'informations récentes encourageait effectivement à revisiter, chez cette espèce, le métabolisme de la proline, généralement décrit, *via* son accumulation, comme un symptôme de stress (Szabados and Savouré 2010), sous l'angle de son implication potentielle dans les processus de développement et de recyclage d'azote provoqués lors de la sénescence foliaire indépendamment de toute contrainte osmotique (Lehmann *et al.*, 2010). Plusieurs études récentes, dont celles conduites dans le laboratoire d'accueil, ont pu faire le constat d'une activation générale, pendant la sénescence foliaire, des gènes impliqués dans la catabolisme oxydatif de la proline, notamment au niveau de la première étape de conversion de la proline en P5C (Pyrroline-5-carboxylate) catalysée par la Proline déshydrogénase (ProDH) généralement codée par deux familles de gènes *ProDH1* et *ProDH2* (Albert *et al.*, 2012 ; Faes *et al.*, 2015 ; Zhang and Becker ; 2015 ; Chrobok *et al.*, 2016 ; Niogret *et al.*, non publié). L'induction relativement spécifique de copies de gènes *ProDH2* lors de la sénescence foliaire du colza paraît exacerbée plus particulièrement dans les tissus phloémiens (Faes *et al.*, 2015). Nous avons pu faire le constat, dans le chapitre précédent, que la proline libre était beaucoup moins concentrée dans les tissus foliaires sénescents au regard de ce qui se

passer dans les tissus plus jeunes ; il apparaît également que les exsudats phloémiens de tissus foliaires vieillissants sont singulièrement moins riches en proline que ceux de tissus juvéniles. Des observations plus anciennes du laboratoire, faisaient apparaître, chez le colza, que l'accumulation osmoinduite de proline provoquée par un stress hydrique/osmotique était singulièrement moins marquée dans les feuilles sénescentes que dans les feuilles jeunes (Larher *et al.*, 2003). L'oxydation de la proline est mitochondriale et conduit en deux étapes à la formation de glutamate, carrefour essentiel du recyclage de l'azote et dont la production pourrait s'avérer limitante pour assurer l'efficacité optimale de remobilisation des nutriments. Il a été montré récemment qu'au cours du vieillissement foliaire, les mitochondries orchestrent les opérations cataboliques et constituaient des hubs énergétiques et métaboliques essentiels au recyclage nutritionnels (Chrobock *et al.*, 2016). Par ailleurs, des oscillations nyctémérales de la concentration en proline et de l'expression des gènes associés à sa biosynthèse et sa dégradation ont été constatées notamment chez *Arabidopsis thaliana* (Hayashi *et al.*, 2000), au profit d'une activation nocturne de la dégradation de proline.

Ainsi, nous avons cherché à apporter quelques démonstrations expérimentales quant à l'hypothèse que la proline, dont l'origine sera à rechercher, puisse servir de substrat mitochondrial privilégié lors de la sénescence développementale foliaire pour alimenter des métabolismes associés au recyclage de l'azote et fournir potentiellement de l'énergie qui puisse également faciliter les opérations métaboliques de remobilisation de nutriments. Pour ce faire, nous avons suivi l'incorporation exogène de proline marquée (¹⁵N et ¹³C), à la fois pour évaluer les capacités d'exportation des tissus foliaires suivant leur âge et pour apprécier le cheminement métabolique associé à son catabolisme. Au regard de ces flux métaboliques, les niveaux d'expression des gènes codant les ProDH1 et ProDH2 (en multiples copies chez le colza) ont également été suivis. Enfin, disposant de peu d'informations concernant la capacité d'utilisation de la proline par les tissus foliaires pendant la phase nocturne, notamment en situation de sénescence, nous avons cherché à déterminer l'efficacité comparée du catabolisme de la proline au cours de la photopériode.

2. Senescence-induced proline catabolism as a source of substrates and energy for nutrient recycling processes in oilseed rape leaves.

Sylvain DECHAUMET ¹, Anthoni PELLIZZARO ¹, Elise BIZOUERNE ¹, Nathalie MARNET ², Catherine JONARD ¹, Solenne BERARDOCCO ¹, Anne-Marie DENIS ¹, Vanessa CLOUET ¹, Marie Françoise NIOGRET ¹, Alain BOUCHEREAU ¹

¹ INRA, UMR 1349, Institute for Genetics, Environment and Plant Protection (IGEPP), UMR INRA-Agrocampus Ouest-Université de Rennes 1, 35653 Le Rheu cedex, France

² UR117 INRA, Cidricoles Biotransformation des Fruits et Légumes, BP35327, 35653 Le Rheu Cedex, France

Abstract

Leaf senescence is a crucial physiological process for plant development. In oilseed rape, it occurs at two periods in the life cycle of the plant, either during the vegetative phase with the so-called sequential senescence or during the reproductive phase and the monocarpic senescence. During natural vegetative senescence, nutrients such as nitrogen have to be recycled to feed the formation of new organs. After preliminary information that indicated that proline (Pro) catabolism may be activated during senescence in oilseed rape (Albert *et al.*, 2012; Faes *et al.*, 2015) experimental evidences have been brought here that Pro oxidation should serve nutrient recycling processes. From phloem exudate screening, infiltrated ¹³C-Pro destination monitoring and Pro dehydrogenase gene expression measurements in leaf tissues of different ages, we have established that Pro catabolism is stimulated during senescence while its loading properties in the phloem are decreased. Identified labeled amino acids give insight into the possible recruitment of Pro to feed glutamate and glutamine biosynthesis, ammonia recycling and nitrogen re-allocation to sink tissues. Concurrently, Pro oxidation activation could be a way of supplying the mitochondrial electron transfer chain for energy production. Moreover, when the photoperiodic regulation of these metabolic events is considered, it is shown here that Pro catabolism correlated with the activated expression of ProDH genes is exacerbated during the dark period, indicating that Pro contribution to energy supply and mitochondrial functioning could be strengthened at this time.

Key words: *Brassica napus*, amino acids, phloem exudate, isotopic labelling, proline dehydrogenase, photoperiodic control

2.1. Introduction

Nutrient use efficiency is a major attribute of crop performance and yield determination (Bouchet *et al.*, 2016). Urge research investments are implemented to dissect molecular players of nutrient utilization by cultivated plants and to highlight their corresponding genetic architecture, regulation framework and environmental dependence (Reich *et al.*, 2014). Overall nutrient use machinery may be physiologically deconvoluted into nutrient acquisition, assimilation, partitioning, allocation and valorization processes widely controlled by spatio-temporal developmental and environmental events. In particular, nitrogen (N) nutrition of plants is closely monitored as N is an essential and often limiting nutrient. Moreover, agronomic fertilization activities are often poorly adapted to the specific needs of the plant and to environmental health. Nitrogen use performance improvement remains a major breeding challenge for main cropping systems thus requiring more sustained attention from agronomic research on this issue. As for other nutrient, N use efficiency relies on N absorption and N utilization strategies, the latter being largely dependent to organic N recycling all along the plant developmental cycle. These N remobilization events, mainly governed by trophic relationships established between source and sink organs, are generally exacerbated during developmental senescence both during the vegetative and during the reproductive stages. During leaf senescence, chloroplast are progressively degraded with alteration of the photosynthetic machinery leading to an inherent decrease of the biosynthesis of carbon (C) photoassimilates such as sugars and of nitrate assimilation (Jeong *et al.*, 2004; Wingler *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008; Desclos *et al.*, 2009; Guiboileau *et al.*, 2012; Watanabe *et al.*, 2013). In C3 plants, 75 % to 80 % of total leaf nitrogen is allocated to chloroplasts, primarily as photosynthetic proteins such as Rubisco (Izumi *et al.*, 2010). Remobilization is mainly linked to the recycling and release of amino acids and sugars by increased proteolysis and lipolysis (Lim and Nam 2007; Roberts *et al.*, 2012).

The main mobile forms of nitrogen in senescent leaves are amino acids, small peptides, ammonium, urea and nitrate. Amino acids and peptides, released from proteolytic activities, would be the predominant forms of recycling and would also help to re-allocate carbon (and sulfur) (Masclaux *et al.*, 2000; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006). Remobilization of inorganic nitrogen during leaf ageing would depend on the pool size of mineral nitrogen stored in the leaves before the onset of senescence. The fact that some nitrate, ammonium and urea transporters are induced during leaf senescence suggests that they contribute to the remobilization of inorganic nitrogen from senescing tissues

(Kojima *et al.*, 2007; Bohner *et al.*, 2015). Several studies in the *Brassicaceae* show that the most abundant amino acids in the phloem are glutamine (Gln), serine (Ser), asparagine (Asn), glutamate (Glu), and aspartate (Asp), depending on the genotype, the stage of development and environmental conditions (Tilsner *et al.*, 2005; Diaz *et al.*, 2006; Howarth *et al.*, 2008). It is assumed that the loading of amino acids into the phloem would be under the control of Amino Acid Permease transporters (Tegeder and Ward 2012) and the over concentration of amino acids in *Brassica napus* phloem sap would not be limited by these transporters (Tilsner *et al.*, 2005).

Efficiency of protein nitrogen recycling is also dependent on the upstream proteolytic activities and consecutive transformation of peptides and proteolytic amino acids towards long-distance mobile forms. Production and maintenance of energy which should facilitate these biochemical transformations and the removal of nutrients are absolute prerequisites to remobilization performances. Maintenance of respiratory activity of the mitochondria appears to be essential throughout the process of leaf ageing (Avila-Ospina *et al.*, 2014). Recently, studies performed in oilseed rape showed that among the many genes whose expression was induced during leaf senescence, those controlling the oxidative and mitochondrial degradation of proline were activated (Albert *et al.*, 2012; Faës *et al.*, 2015).

Proline is a proteinaceous amino acid that accumulates at important levels in many species, including *Brassicaceae*, in response to various environmental stresses (Verbruggen and Hermans 2008). This amino acid is highly soluble and can accumulate at very high concentrations in the cytoplasm without disrupting primary metabolism or cellular structures (Larher *et al.*, 2003). It is thus considered as a multifunctional compatible solute whose actions related to stress tolerance, still subject to debate, is involved in osmoprotection, osmoregulation, redox homeostasis, chemical chaperoning and/or nitrogen and reducing power storages (Szabados and Saviouré 2010). Proline is synthesized from glutamate in cytosol and potentially in chloroplasts. Proline accumulation and homeostasis are strongly regulated by the balance between degradation, synthesis and transport (Szabados and Saviouré 2010). During water stress, favorable to accumulation, the synthesis of proline is exacerbated while its degradation is suppressed (Kishor *et al.*, 2005). The first limiting step in the oxidative degradation of proline in mitochondria is catalyzed by Proline Dehydrogenase (ProDH) and produces reducing power (FADH₂) (Liang *et al.*, 2013). This enzymatic reaction generates Pyrroline-5-carboxylate (P5C) which will be converted via a non-enzymatic reaction to glutamate-γ-

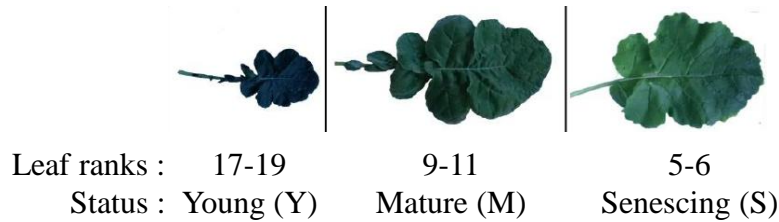
semialdehyde reduced in turn to glutamate by P5C dehydrogenase (P5CDH) (Kiyosue *et al.*, 1996). Proline degradation directly feeds the mitochondrial respiratory chain via the oxidative production of electrons, and in this way, 30 ATP equivalents can be produced from a single proline molecule, which gives this metabolism a high potential (Atkinson 1977).

Proline metabolism is subjected to circadian variations leading to its accumulation during the light periods and decrease during the dark periods (Sanada *et al.*, 1995). These fluctuations in Pro contents reflect the regulation of genes involved in the catabolic (ProDH) and anabolic (P5CS) pathways since *P5CS* genes are activated during the day whereas *ProDH* genes are activated during the night (Hayashi *et al.*, 2000). According to the authors, gene regulation is governed by variation in water content during the two periods instead of light. Moreover, Pro content is prone to post-translational regulations since the proteins are stable for 20 to 30 hours. As today, these regulations remain to be revealed and little information is available during leaf senescence.

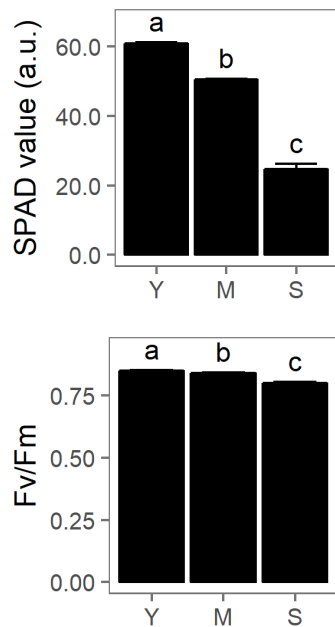
Evidence of Pro accumulation during senescence has been previously described in detached leaves treated with senescence-related phytohormones (Reddy and Veeranjanyulu 1991). In oilseed rape, it was shown that at an equal level of leaf water potential, more proline accumulated in the youngest leaves than in the oldest ones and such gradients were interpreted as a preservation of catabolic performance in ageing tissues (Albert *et al.*, 2012; Faës *et al.*, 2015). Moreover, the high abundance of *ProDH2* transcripts measured in senescent leaves could be related to proline utilization efficiency providing reducing power for cell degradation mechanisms when chloroplasts become dysfunctional, an early process in autophagy (Faës *et al.*, 2015). In this context, Pro implication as a mitochondrial substrate for energy production and/or for nitrogen remobilization via Glu during senescence has been suggested (Zhang and Becker 2015; Faës *et al.*, 2015; Funck *et al.*, 2010), although definitive evidence is still missing.

The aim of the study was to evaluate the contribution of proline catabolism to the production of recycling substrates from protein degradation during leaf senescence and to the supply of mitochondrial metabolism for energy production. After evaluation of proline deposition efficiency in leaf tissues and phloem exudates, the metabolic partitioning of proline catabolites directed to either energetic and/or trophic processes was followed by [¹³C₅]-Proline infiltration into isolated leaf tissues considering both developmental stages and photoperiodic exposure conditions. New information is being provided about the

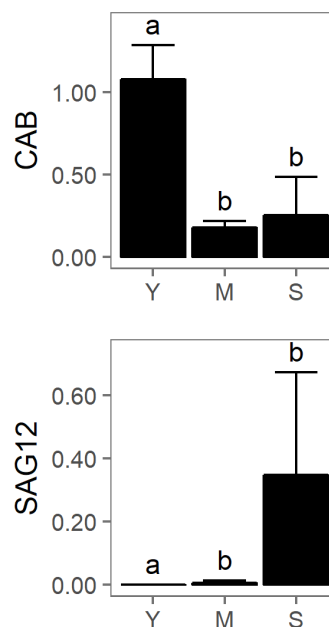
A Leaves groups by developmental status



B Physiological status



C Molecular status



D Chemical status

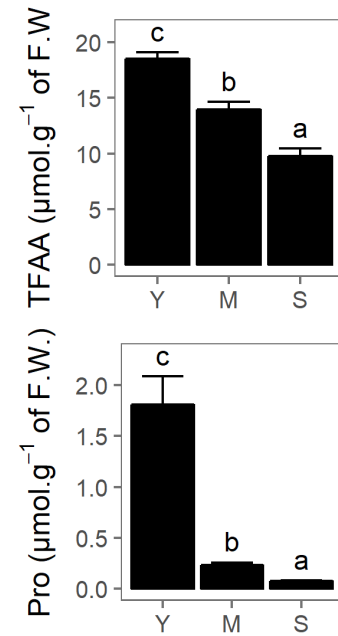


Figure II-1: Photographs of representative leaves of the three groups (Y: young, M: mature, S: senescing) used during the experiment (A). Each group has been characterized by two physiological parameters (B): chlorophylls content as SPAD measurement and quantum efficiency of the photosystem II (Fv/Fm) and two molecular markers of development (D): *SAG12* and *CAB* relative expressions. The three groups had distinct total free amino-acids and proline content (C, leaves disks infiltrated with MES). Error bars represent the IC95 of 6 biological replicates) and different letters represents a *p*-value below 0.5 between leaf status (Wilcoxon test).

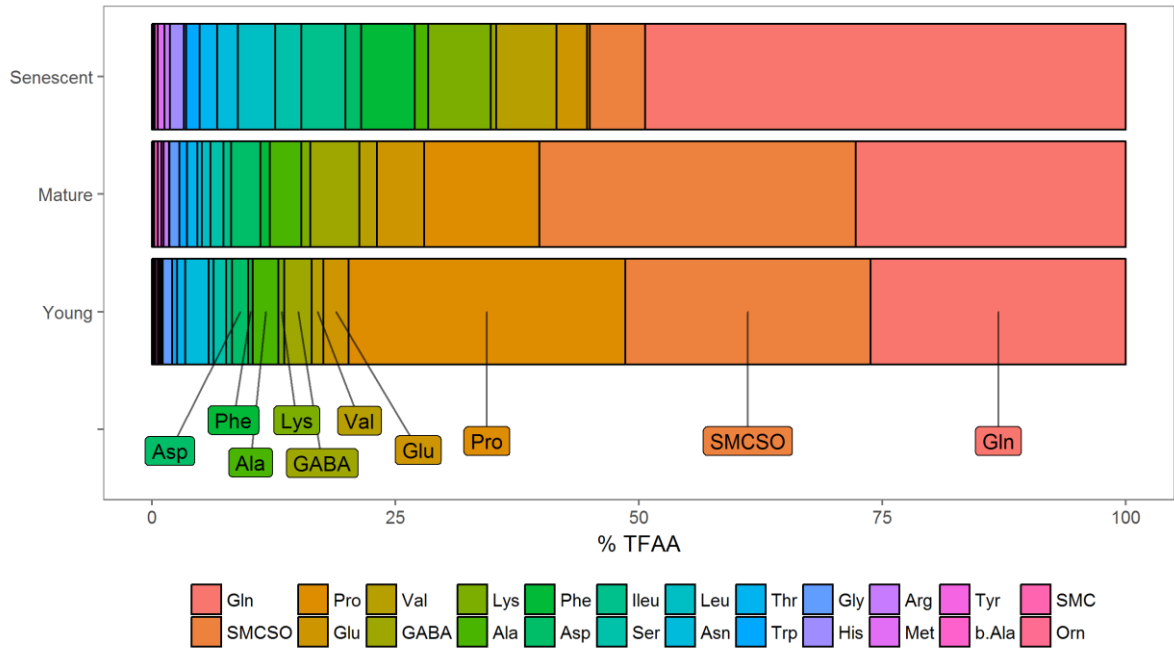
integration of proline oxidation into amino acid metabolism considering the space-time events guiding leaf development and especially senescence and about its contribution to N-nutrient recycling and respiratory metabolism feeding.

2.2. Results

2.2.1. Characterization of the physiological status of the leaves

As senescence occurs in a progressive way and is dependent on the growth conditions, the first step was to validate the experimental conditions to sample leaves with homogeneous developmental status and objectified gradual ageing status. Therefore, their developmental state was evaluated through physiological (Bresson *et al.*, 2017), and molecular markers known to be related to senescence processes (Noh and Amasino 1999; Faës *et al.*, 2015). Three samples were a priori considered based on phyllotaxis (nodal position on the plant axis) and attributed to young (which ranged from ranks 17 to 19), mature (from ranks 9 to 11) and senescent leaves (from ranks 5 to 6) after 8 weeks of growth under controlled optimized conditions (figure II-1A). As physiological markers, chlorophyll content (as SPAD unit) and Fv/Fm ratio (reflecting the maximal quantum yield of PSII photochemistry) were measured. The former expectedly decreased as leaves aged from 60.8 ± 2.2 to 50.5 ± 1.5 a.u. between young and mature leaves and 24.6 ± 6.8 a.u. in senescing leaves whereas Fv/Fm decreased only in senescent leaves from 0.85 ± 0.01 and 0.84 ± 0.01 in young and mature leaves respectively to 0.80 ± 0.02 in older ones (figure II-1B). Expression of key ageing-related genes in *B. napus* has been quantified by qRT-PCR targeting *SAG12*, a senescence-enhanced genes coding a putative cysteine protease and *CAB*, a senescence down-regulated gene coding a chlorophyll a/b-binding protein (Izumi *et al.*, 2012). Accordingly, *SAG12* was only expressed in senescent leaves whereas *CAB1* was mostly expressed in young leaves and also detected in mature and young leaves. The three collected samples thus finely reflected contrasted developmental situations from expanding to senescing phases. Prior to further investigations assigned to proline metabolism efficiency, these three lots of sampled leaves were analyzed for their amino acid profiles and proline contents. It could be observed that total free amino acid and proline content decreased when leaves aged, from respectively 18.5 ± 1.7 and 1.8 ± 0.8 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of fresh weight (FW) in young leaves to 9.8 ± 2.0 and 0.08 ± 0.03 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of FW in senescing leaves. (figure II-1C). Senescence is thus clearly associated to a lessening of the amino acid pool and a depletion of free proline.

A Free amino acids proportions in phloem exudates



B Age-dependent leaf exudation performance of ¹⁵N-Pro

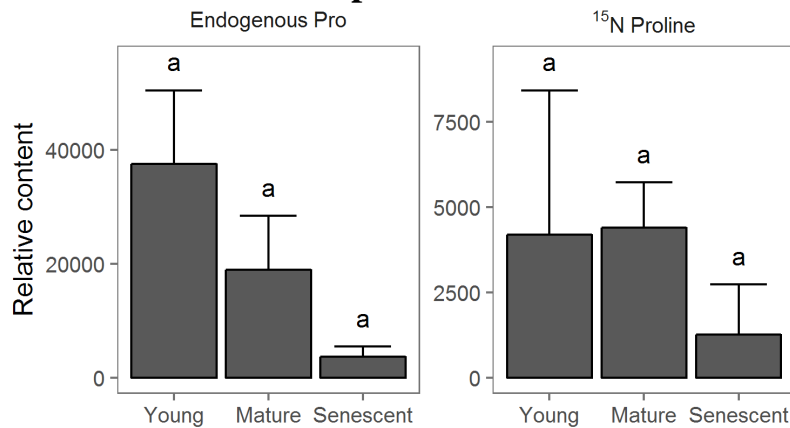


Figure II-2: Free amino acids as proportions of total free amino acids (TFAA) in phloem exudates of young, mature and senescent leaves sampled with the EDTA facilitated method (A). Proline levels in tissues and phloem exudates from young, mature and senescent leaves after [¹⁵N]-Pro infiltration of in the lamina (B). Error bars represent the IC95 of 3 biological replicates. Different letters represents *p*-value below 0.5 (Wilcoxon test) between leaf status.

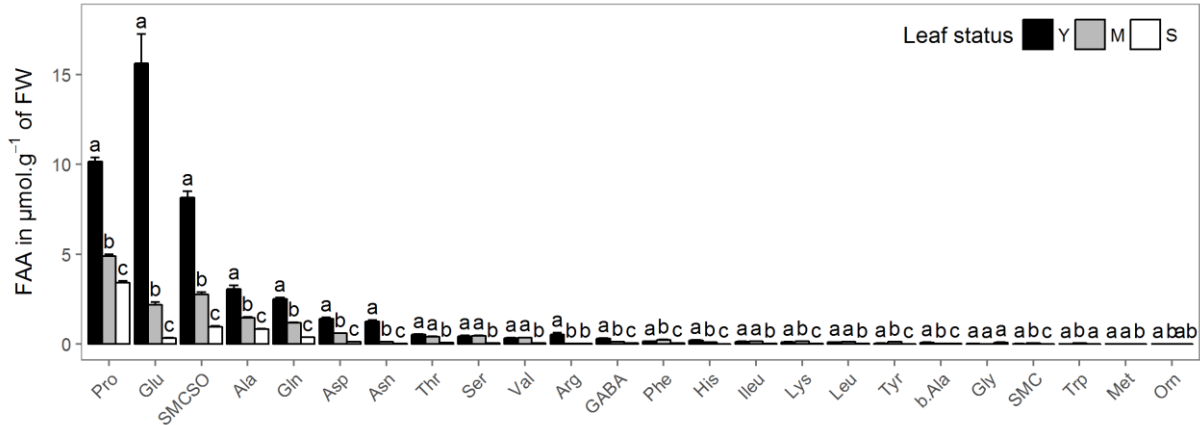
2.2.2. Free amino acids in phloem exudates

Prior to exploration of proline catabolism efficiency in the differentially developed leaf tissues, proline exportation performance was investigated as a putative way to adjust endogenous levels and as a contributor of nitrogen remobilization in oilseed rape. Endogenous proline was thus quantified in phloem exudate collected from young, mature and old leaves. Moreover, ^{15}N -proline was exogenously supplied to the three types of leaves to appreciate exportation performance of native proline. First phloem saps from young, mature and old leaves were collected through the EDTA-facilitated method (figure II-2A). Since the evaporation and the exact exudation volumes could not be assessed precisely by this method, the resulting profiles were not quantitative and were expressed as percentage of total free amino acids (%TFAA). The main amino acids in phloem saps were Gln, SMCSO and Pro, with different proportions regarding the leaf developmental status. For instance, Gln proportions increased from young to old leaves (respectively from 23.2 ± 8.3 to 59.9 ± 12.1 %) whereas SMCSO and Pro decreased significantly (respectively from 30.0 ± 12.9 to 2.4 ± 2.4 %TFAA for SMCSO and from 27.7 ± 5.5 to 1.3 ± 1.6 %TFAA for Pro). Then, to assess the leaf potential to loading Pro into the phloem, ^{15}N -Pro was infiltrated on attached leaves in the lamina and detected using mass spectrometry in the phloem sap of the corresponding leaf (figure II-2B). The results were not demonstrated to be significantly differentiated because of large variations observed between replicates but two tendencies could be drawn: first, the proline content in phloem was the highest in young leaf sap and decreased by 50 % in mature leaves and by 90 % in senescent leaves, similarly to profiles observed for native amino acids as described before. Secondly, ^{15}N -Pro levels were similar in young and mature leaves and decreased by 70 % in senescent leaves. Hence, it seems that the potential to load Pro in the phloem of senescing leaves were highly decreased since catabolic performance were increased.

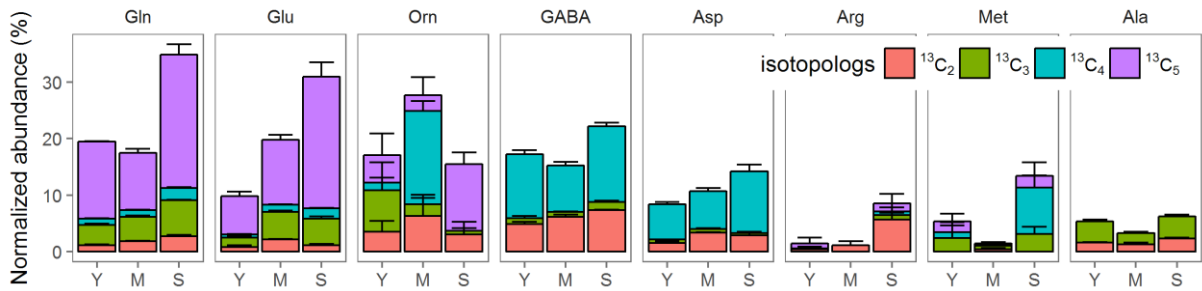
2.2.3. Proline degradation during leaf development

Since leaf ageing looks clearly associated to free proline pool depletion without concurrent activation of exportation efficiency and based on previous observations highlighting overexpression of *ProDH* genes during senescence (Faës *et al.*, 2015), next objectives were to bring direct evidences of transcriptional activation of proline oxidation together with details about metabolic fates of proline catabolism. Thus, the metabolic pathways of proline utilization were evaluated by infiltration of [$^{13}\text{C}_5$]-Proline in leaf disks (from young, mature and senescent leaves) and by measuring the ^{13}C enriched isotopologs in free amino acids by mass spectrometry. As a preliminary step, the optimal experimental

A Amino acids content in infiltrated leaf disks according to their developmental status



B Normalized isotopologs distribution of the FAA with more than 4 % of incorporation



C Diurnal ProDHs transcript levels

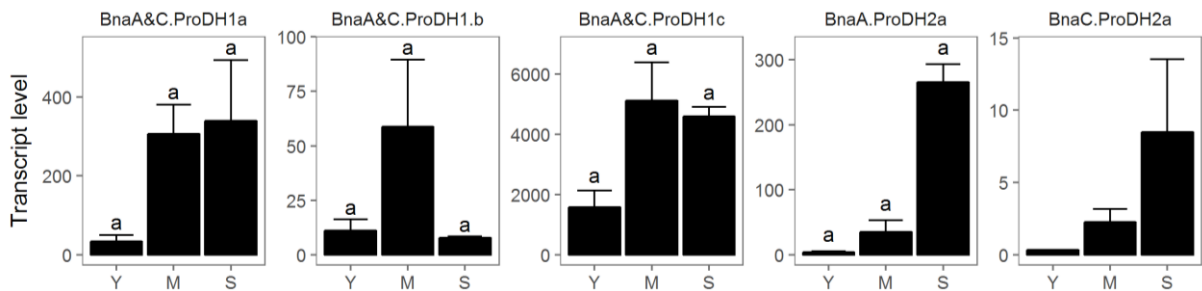


Figure II-3: Amino acid profiles, isotopolog distribution and *ProDH* gene expression levels in isolated tissues from leaves collected during the day at the three developmental stages (young: Y; mature: M and senescing: S). Free amino acid contents after $^{13}\text{C}_5$ -Pro incorporation (A). Corrected and normalized abundance of amino acid isotopologs after $^{13}\text{C}_5$ -Pro incorporation (B). For easily reading, isotopologs are noted ^{13}C followed by the number of C incorporated (1 to 5). In parallel, transcript levels (C) of three *BnaA&C.ProDH1* genes (a, b and c) and two *ProDH2a* (BnaA and BnaC) genes. Error bars represent the IC95 of 6 biological replicates for A and B and 3 for C. Different letters represents p -value below 0.5 (Wilcoxon test) between leaf status.

conditions were set to ensure the proper incorporation of proline in all samples and convenient conditions of metabolization. Exogenous proline concentration, infiltration time, incubation time and light condition of incubation were tested (supp. figure II-1). Thus, a concentration of 40 mM [$^{13}\text{C}_5$]-Proline in the infiltration medium of leaf explants incubated for 4 h under light or dark conditions was set up successfully for the three types of leaves (supp. figure II-1). Total free proline content in leaf disks after a 4h-infiltration/incubation period was higher in young than in mature leaves and was the lowest in senescing leaves, respectively 9.0 ± 3.3 , 5.0 ± 1.5 , and 3.4 ± 0.8 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of FW. Moreover, achieving the incubation step under dark conditions had no effect on proline stored in young and mature leaves, but decreased by 20 % in senescing leaves compared to the light conditions. Using those conditions, the overall free amino acid profiles has been assessed. The most abundant amino acids in leaf tissues after incubation (figure II-3A) were by decreasing order Glu (15.6 ± 7.3 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of FW), Pro (10.1 ± 1.1 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of FW), SMCSO (8.2 ± 1.6 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of FW), α -Ala (3.1 ± 0.9 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of FW), Gln (2.5 ± 0.4 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of FW), Asp (1.4 ± 0.3 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of FW) and Asn (1.3 ± 0.4 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of FW), but with some clear differences in relative contents regarding the leaf developmental status. For instance, Glu, SMCSO, Ala, Gln, Asp and Asn were highly predominant in young leaves compared to mature and senescing leaves. The incorporation of ^{13}C from [$^{13}\text{C}_5$]-Pro was assessed by measuring the percentage of ^{13}C excess in free amino acids extracted from leaf explants incubated under light conditions (supp. figure II-2). As expected, proline was the most enriched amino acid, with up to 96.7 ± 0.1 % of [$^{13}\text{C}_5$]-Pro in senescing leaves and 46.2 ± 1.0 % of [$^{13}\text{C}_5$]-Pro in young leaves. This lower percentage in mature and young leaf tissues should probably be attributable to a dilution of [$^{13}\text{C}_5$]-Pro in endogenous [^{12}C]-Pro more concentrated in younger leaves (figure II-1D). Normalized abundances (considering [$^{13}\text{C}_5$]-Pro/[^{12}C]-Pro ratio) were then used to compare isotopologs distribution in amino acids between treated tissues (figure II-3B). ^{13}C incorporation into amino acids was either (1) on the full C skeleton, resulting from very close conversion of [$^{13}\text{C}_5$]-Pro, (2) or on incomplete C number, resulting either from the partial incorporation of [$^{13}\text{C}_5$]-Pro skeleton or multiple reactions resulting in the dispersion of the ^{13}C . Since we aimed at tracing close products of Pro degradation, the isotopologs with only one ^{13}C were discarded from the analysis. Some compounds were found as fully labelled whatever the nature of the leaf tissues as $^{13}\text{C}_5$ for Gln, Glu, Orn, and at a much lower level Arg, $^{13}\text{C}_4$ for GABA, Asp, and Met and $^{13}\text{C}_3$ for Ala in variable proportions depending on the compounds and the leaf developmental status. For instance, in young leaves the $^{13}\text{C}_3$ and $^{13}\text{C}_5$ isotopologs of Orn were predominant (respectively 7.3 ± 7.5 % and 4.8 ± 5.8 %), whereas $^{13}\text{C}_4$ was largely

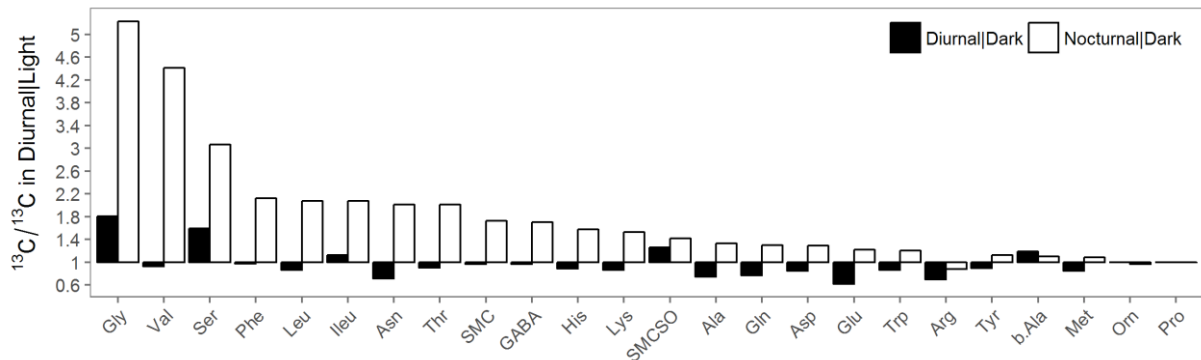
preponderant in mature leaves (16.5 ± 2.6 %) and the $^{13}\text{C}_5$ in senescing leaves (11.8 ± 3.2 %). For Gln, the labelled C were mostly found in $^{13}\text{C}_3$ and $^{13}\text{C}_5$, with increasing abundance during leaf development, from respectively 3.6 ± 0.4 % and 13.6 ± 0.02 % in young leaves to 6.4 ± 0.1 % and 23.6 ± 2.8 % in senescing leaves. Similarly, Glu $^{13}\text{C}_3$ and $^{13}\text{C}_5$ forms ranged respectively from 1.7 ± 0.3 % and 6.8 ± 1.1 % in young leaves to 4.7 ± 0.7 % and 23.3 ± 3.8 % in senescing leaves. Aspartate ^{13}C proportions were also found to increase during senescence but as $^{13}\text{C}_2$ and $^{13}\text{C}_4$ forms, respectively 1.6 ± 0.4 % and 6.3 ± 0.6 % in young leaves and 2.9 ± 0.8 % and 11.0 ± 1.8 % in senescing leaves. Whereas GABA predominant isotopologs were $^{13}\text{C}_2$ and $^{13}\text{C}_4$ with little variations between leaves status, ranging from respectively 4.9 ± 0.7 % and 11.3 ± 1.0 % in young leaves to 7.4 ± 0.7 % and 13.4 ± 1.0 % in senescing leaves. $^{13}\text{C}_2$ and $^{13}\text{C}_3$ -Ala were mostly found in young and senescing leaves at respectively 1.6 ± 0.1 % and 2.4 ± 0.2 % for $^{13}\text{C}_2$ and 3.7 ± 0.6 % and 3.9 ± 0.4 % in senescing leaves. Interestingly, Met incorporated ^{13}C in young and mature leaves as $^{13}\text{C}_3$ (respectively 2.4 ± 4.2 % and 0.6 ± 0.7 %) while as $^{13}\text{C}_4$ and $^{13}\text{C}_5$ in senescing leaves (respectively 8.2 ± 3.3 % and 2.1 ± 3.6 %). In the same way, $^{13}\text{C}_2$ -Arg was found in all leaves and $^{13}\text{C}_5$ -Arg was only found in senescing leaves (1.5 ± 2.5 %).

Concomitantly to the incorporation of [$^{13}\text{C}_5$]-Pro in leaf disks, expression levels of two *ProDH2* and three *ProDH1* homolog genes were measured on leaf tissues from the three developmental status (young, mature and senescing) (figure II-3C). Expression levels between young, mature and senescing leaves were not demonstrated to be significantly different with our experimental design, probably due to the lack of repetitions, but strong tendencies could be described. For instance, *BnaA&C.ProDH1a* and *BnaA&C.ProDH1c* had the same expression pattern, with high levels in mature and senescing leaves. Whereas *BnaA.ProDH2a* and *BnaC.ProDH2a* were mostly expressed in senescing leaves. Only *BnaA&C.ProDH1.b* seems to be specifically expressed in mature leaves.

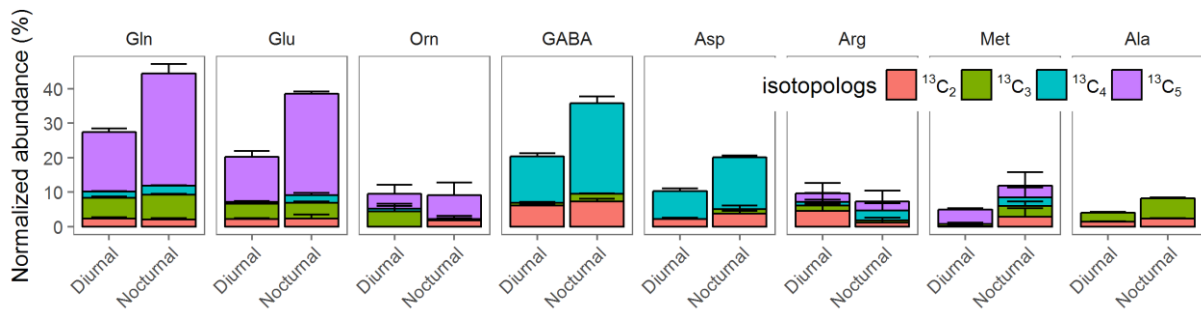
2.2.4. Light and photoperiod impact on proline mobilization

Since metabolic processes are light-dependant and considering the already observed light-related regulation of proline metabolism (Sanada *et al.*, 1995; Hayashi *et al.*, 2000; Espinoza *et al.*, 2010), [$^{13}\text{C}_5$]-Pro incorporation into amino acid metabolism has been followed under different illuminated conditions. First, leaf explants were collected during the day and incubation after [$^{13}\text{C}_5$]-Pro incorporation was conducted for 4h under either light or dark conditions. Second, leaf explants have been collected at the end of the nyctoperiod and have been submitted to same labelling experiments. Results are

A Ratios of ^{13}C incorporated in dark conditions by diurnal disks infiltrated under light



B Normalized isotopologs distribution of the FAA with more than 4 % of incorporation



C Ratios of nocturnal over diurnal ProDHs transcript levels

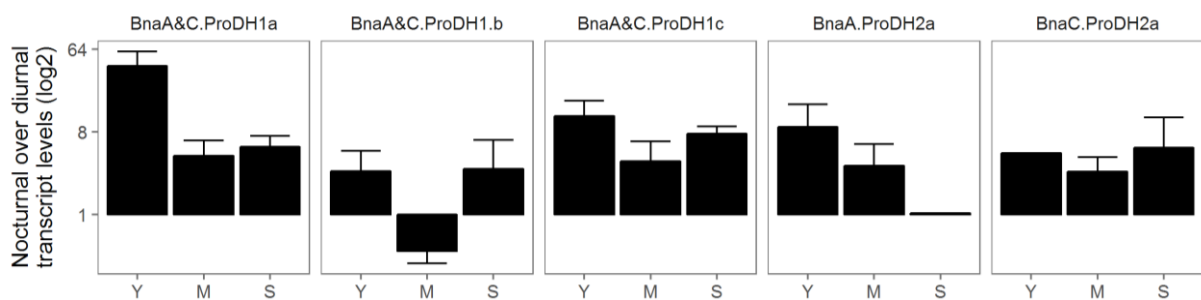


Figure II-4: Amino acid profiles, isotopolog distribution and *ProDH* gene expression levels in isolated tissues from leaves collected during the night at the three developmental stages (young: Y; mature: M and senescing: S). The incorporation ratio of ^{13}C in amino acids from day (white bars) and night (black bars)-collected senescing leaves after incubation under dark conditions by the ^{13}C incorporated in day-collected leaves incubated under light conditions after infiltration with $[^{13}\text{C}_5]\text{-Pro}$ (A). The isotopolog relative abundances of the 14 most represented free amino acids are shown for the same conditions (B). Transcript level ratios (\log_2 transformed) of three *BnaA&C.ProDH1* genes (a, b and c) and two *ProDH2a* (BnaA and BnaC) genes in night-collected tissues over day-collected ones from young (Y), mature (M) and senescing leaves (C). Error bars represent the IC95 of 3 biological replicates. Different letters represents *p-value* below 0.5 between leaf status (Wilcoxon test).

expressed as the ratios of ^{13}C incorporated in free amino acids compared to data obtained from diurnal leaf explants incubated under light conditions (supp. figure II-3). As a matter of fact, from day-collected leaf tissues, incubation of [$^{13}\text{C}_5$]-Pro-infiltrated tissues under either light or dark conditions has little incidence on amino acid labelling. For instance, in young and senescing leaves, incorporation of ^{13}C in Gly was positively affected under light incubation by 1.8 times in both tissues together with Ser in senescing leaves (1.6 fold change). Light incubation also had a negative effect on Glu ^{13}C incorporation in senescing leaves by 0.6 times (figure II-4A). In comparison, stronger variations were observed from night-collected tissues in all leaves: in young leaves, ^{13}C incorporation was positively affected in Arg, Glu, Asp and GABA (from 1.6 to 2.4 fold changes), whereas in mature leaves, only Ser and Arg were affected (respectively 1.6 and 2.1 fold changes). When explants were collected from night-exposed plants and incubated under dark conditions, incorporation ratios were significantly higher and positively affected for almost all amino acids (figure II-4A). Most differences were found in Gly, Val and Ser (respectively 5.2, 4.4 and 3.1 fold changes) compared to diurnal-collected leaves infiltrated under light. The sampling photoperiod also impacted on isotopolog distributions for most labelled amino acids as could be detailed for isolated tissues from senescing leaves (figure II-4B). ^{13}C incorporation in fully labelled amino acids was higher in night-collected tissues, with Gln (+29 %), Glu (+79 %), Orn (+37 %), GABA (+49 %), Asp (+46 %) and Ala (+55 %) being more labelled. Whereas in Arg and Met, the isotopologs distribution changed between the two illuminated conditions, from $^{13}\text{C}_2$ and $^{13}\text{C}_3$ to $^{13}\text{C}_4$ and $^{13}\text{C}_5$ for Arg and from $^{13}\text{C}_5$ only to $^{13}\text{C}_3$ and $^{13}\text{C}_5$ for Met.

Concomitantly, *ProDHs* transcript levels were also measured in night-collected plants before the infiltration/incubation step (figure II-3C). As in day-sampled tissues, the expression levels between young, mature and senescing leaves were not computed to be significantly different within our experimental design due to the lack of replicates, but strong tendencies could be described. All *ProDHs* transcript levels were higher in night-collected leaves compared to diurnal-exposed leaves except for *BnaA&C.ProDH1.b* in mature leaves. *BnaA&C.ProDH1a* appeared to be highly expressed in young leaves, whereas *BnaA&C.ProDH1c* and *BnaC.ProDH2a* were slightly more expressed in senescing leaves.

Interestingly, lighting conditions of incubation after [$^{13}\text{C}_5$]-Pro incorporation in night-sampled tissues had consequences of ^{13}C partitioning depending on leaf developmental stages. (figure II-4). Young leaves were the least affected, with an increase of ^{13}C

incorporation from Pro in Ser when infiltration occurs under light (+30 %) and an increase in Asn under dark conditions (+37 %). In mature leaves, overall ^{13}C incorporation was higher under light compared to dark conditions, by decreasing order: SMCSO (+70 %), His (+63 %), Lys (+61 %), Ileu (+48 %), Asn (+45 %), Leu (+45 %) and Val (+24 %). A more disparate effect was observed in senescing leaves, with an increase of ^{13}C incorporation in, by decreasing order: Asn (+50 %), SMCSO (+40 %) and His (+28 %) under light, and an increase in Val (+79 %) and Ser (+72 %) under dark conditions.

2.3. Discussion

The phloem sap composition reflects the main chemical forms of nutrients being remobilized from source to sink tissues. Free amino acids probably constitute main mobile forms of nitrogen reallocation. What has become evident in our study is the strong qualitative and especially quantitative variability of the amino acid composition of the phloem sap depending on the age of the leaf tissues from which it originated. 75 to 80 % of the leaf exudate amino acid composition is completed by Gln, SMCSO and Pro in young and mature tissues since only constituting around 50 % in senescent leaves. Activated proteolysis during senescence associated with the stimulation of the proteolytic amino acid re-allocation processes may result in the depletion of free amino acids in leaf blade and lead to a diversification of the nature of the exported amino acids. Gln is measured as the the main amino acid found in the phloem sap, as already observed in a wide range of plants species (Corbesier *et al.*, 2002; Chaffei *et al.*, 2004; Byrne and Miller 1990; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006) but in variable proportions depending on the developmental stage of the source leaf. Gln is often described to be accompanied by Asn to translocate recycled N, which does not seem to be the case here in oilseed rape whatever the developmental status of leaves. In mature and young leaves, SMCSO (also known as methiin) is also shown to be highly represented in phloem sap. This uncommon sulfur amino acid derivative appears more specifically representative of *Allium* and *Brassica* species (Whittle *et al.*, 1976; Gaudin *et al.*, 2014). Many factors, including species, genotype differences, nutrient supplementation, growth and environmental conditions and times of harvest and subsequent storage have been shown to display great influence on SMCSO concentrations (Edmands *et al.*, 2013). Until now, no evidence has been suggested about the putative role of SMCSO as a sulfur and nitrogen carrier for long distance trophic relationships between source and sinks, even if it would be particularly tempting to corroborate such an hypothesis. In young leaf phloem sap, Pro is also found

in higher proportions than SMCSO and Gln. Evidences of Pro occurrence in the phloem saps of different species have been reported both under normal and water-stressed conditions (Weibull *et al.*, 1990; Girousse *et al.*, 1996). Both Pro and SMCSO relative proportions dramatically decrease in the phloem composition of senescent leaves although Gln proportion is shown to increase. As confirmed in our study, during leaf senescence, Pro content decreases dramatically in oilseed rape, as occasionally observed in other species (Venekamp and Koot 1984; Madan *et al.*, 1994) while proteolysis activities release high amount of free amino acids in cells. As such, Pro may be actively translocated to sink organs or consumed locally to sustain cell metabolism. The Pro exudation potential in the phloem in relation to the age of the leaf tissues was therefore tested by lamina incorporation and sap screening of exogenous labelled Pro. Thus it was observed that that senescing leaves are not as efficient as young and mature leaves to translocate Pro towards the phloem. Whether it is due to a inefficiency of transporters involved in phloem loading, a competition with other free amino acids which are massively remobilized during senescence or local degradation remain to be elucidated. Overall, it is assumed that Pro translocation via the phloem is not enhanced during senescence and therefore cannot explain Pro depletion. Leaf senescence is associated with multiple catabolic reactions necessary to produce mobilized forms of nutrients dedicated to sink nutrition as well as energy to sustain cell ultimate functioning and transport system accomplishment (Masclaux *et al.*, 2000; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006; Lim and Nam 2007). Proline catabolism has an energetic potential of 30 eq. ATP and leads to the production of Glu which in turn can be converted to Gln (Liang *et al.*, 2013). Connecting proline metabolism and signaling pathways in plant senescence has already been proposed but without much convincing elements for now (Zhang and Becker 2015). We had already observed, in oilseed rape, that stress-induced proline accumulation was generally significantly lower in senescent tissues than in younger ones; this was also the case in the cotyledons, thus formulating the hypothesis that tissues under intensive metabolic remobilization phase can not accumulate proline and that the remobilization process prevails over the deposition (Albert *et al.*, 2012; Larher *et al.*, 2013). In this work, we have measured oxidative performance and have chased catabolic products of labelled Pro in leaf tissues of different ages together with transcript quantitation of ProDH genes associated to the first step of Pro catabolism to P5C. Amino acid products derived from Pro oxidation were quantified and isotopologs characterized after incorporation of [¹³C5]-Pro in leaf explants and a 4h metabolization period. Most of the ¹³C is found in Gln, Glu, GABA, Orn and Arg with increasing rates of incorporation as leaves get older. Fully

labelled Glu and Gln, resulting from direct conversion of Pro, increase by 71 % and 42 % respectively compared to young leaves. Moreover, most *ProDH1* gene isoforms are over-expressed in mature and senescing leaves and *ProDH2* gene isoforms are induced in senescing leaves. It can be assumed that the potential of Pro degradation is increased during leaf ageing and potentially directed toward the formation of Glu and re-assimilation of ammonium to form Gln as a putative remobilizable N resource. Previous works, confirmed here, had suggested that *ProDH2* genes are induced in *B. napus* senescing leaves especially in vascular tissues (Faës *et al.*, 2015) as also observed in *A. thaliana* (Funck *et al.*, 2010). Such a localization fits well with the functional coupling of the oxidation of proline and the re-assimilation of proteolytic ammonium by glutamine synthetase (GS) since GS has frequently been described in different species to be active in phloem tissues (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006). While GS in the phloem has been seen as playing a major role in controlling Pro production under water stress (Brugiere *et al.*, 1999), we propose from the present results that Pro metabolism exacerbated during senescence may feed ammonium recycling and Gln production through GS activity for N draining to sink tissues.

In young leaves, Pro carbons are found to be incorporated mostly in Gln, Glu and GABA, participating in Glu derived amino acids formation possibly to sustain protein formation during leaf early development. There are at least two pathways linking Pro to GABA: either via the polyamine pathway (from Orn or Arg) or directly from Glu by decarboxylation. Since Pro-labelled carbons are mostly found in Glu in young leaves, it is more likely that GABA (with 4 labelled carbons) production from Pro derived from Glu. Compared to young leaves, Pro orientation toward Orn is increased in mature leaves. Ornithine derived from P5C via the reversible OAT can join the urea cycle to produce Arg or the polyamine pathway (Sobieszczuk-Nowicka *et al.*, 2015). Since ¹³C is not found in Arg, it is more likely that Orn derived from Pro is redirected towards polyamine biosynthesis which have been shown to accumulate before senescence; this must be confirmed (Kaur-Sawhney and Galston 1979; Sobieszczuk-Nowicka 2017).

The circadian cycle exert large known effects on the primary and secondary metabolisms (Mora-García *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2017; Seki *et al.*, 2017), source/sink relationships (Haydon *et al.*, 2011) and stress related responses (Espinoza *et al.*, 2010). Whether metabolic recycling processes operating during senescence are regulated by light conditions and remain effective during night conditions are not really explored. Since genes involved in Pro metabolism are known to be modulated by light and/or water

content (Sanada *et al.*, 1995; Hayashi *et al.*, 2000), it is more likely that Pro metabolism is also affected by light and photoperiod during senescence. It was observed in Arabidopsis that proline content increased and decreased under light and dark periods, respectively, and that the oscillation was also involved in P5CS and ProDH gene expression levels (Hayashi *et al.*, 2000). We therefore investigated whether the activated catabolism of proline during leaf senescence could be exacerbated during the night period. To evaluate changes in the incorporation of Pro-derived carbons during the circadian cycle, labelled Pro was incorporated in tissues collected either at the end of the night or during the day periods. Moreover, after infiltration of leaf explants, incubation have been performed under dark or light conditions. Thus, incorporation of ¹³C-Pro in night-sampled tissues is shown to be highly stimulated in senescing leaves compared to the young and mature ones with higher incorporation rates in Gln Glu, GABA, Orn and Asp. Since during night, light is not available to provide energy, cells rely on internal storage (Bouma *et al.*, 1995). During senescence, as remobilization processes occurs, internal storage of energetic substrates are depleted and translocated in sink organs. Accordingly, senescing tissues need to produce energy to sustain cellular processes and especially during the night period. The catabolism of Pro, which is mainly directed toward Glu and Gln production during the day, is even more active during the night resulting in the putative production of energy since ProDH activity has been demonstrated to insert directly electrons into the respiratory chain (Schertl and Braun 2014). Interestingly in our work, most ProDHs expression levels are increased during the night in all tissues with some specificities. In young leaves, *BnaA&C.ProDH1a* is more induced in young leaves and *BnaA.ProDH2a* induction gradually decreases between young, mature and senescing leaves. So it looks that the *BnaProDHs* are subject to circadian rhythm-dependent transcriptional regulation, as previously showed in others species (Abrahám *et al.*, 2003). Under dark conditions, Pro catabolism not only feeds Glu synthesis but also GABA and Orn pathways. The GABA shunt provides energy to the TCA cycle via the succinate and produce Glu, Ala or Gly as coproducts (Fait *et al.*, 2008). Ultimately, carbons from Pro are also found to diffuse in multiple less abundant amino acids (Gly, Ser, Val, Phe, Leu, Ileu, Asn and Thr) providing providing valuable information on the ability of leaf tissue to efficiently distribute carbon and nitrogen fluxes even during the night phase.

One question remains about the capacity of senescent oilseed rape leaf tissues to be able to produce proline in sufficient quantity, from proteolytic or other origins, to feed these oxidative processes that would contribute either to produce compounds

remobilisable to other tissues either to feed the energetic functioning of the mitochondria or both.

2.4. Conclusion

In conclusion, the present work provides new information on the re-allocation of carbon and nitrogen in the amino acid metabolism of leaf tissues during their development. More specifically, it is shown that proline could participate in the transport of carbon and nitrogen resources in mature and young tissues. However, during senescence, while proline is generally very poorly accumulated in the leaf blade, its catabolism is rather activated. Transcriptional control of these catabolic activities, especially at the level of the ProDH genes are operated during senescence. The demonstrated production of Glu and Gln under these conditions demonstrates that the oxidation of proline can both feed the phloem transfer of nitrogen in the preferred form of Gln and provide usable electrons for the supply of the respiratory electron transfer chain and energy production. Moreover, if we consider the photoperiodic regulation of these metabolic events, it is shown that the catabolism of proline correlated with the activated expression of ProDH genes is exacerbated during the dark period, indicating that Pro contribution to energy supply and mitochondrial functioning could be strengthened at this time.

It now remains, by expanding the field of investigation of the metabolic destination of Pro both in time and space to confirm the importance of its contribution to support the recycling of trophic resources during senescence. It will also be necessary, where appropriate, to precisely search for the sources of Pro production in the senescent tissues necessary for feeding the energetic oxidation processes.

2.5. Material and Methods

2.5.1. Seed germination and plant growth conditions

Plants of *Brassica napus* cv. AVISO were grown and maintained under vegetative status under the following procedure. Seeds were germinated for three days on a paper soaked in bleach water. Seedlings were transplanted in two liters pots filled with a growing medium (FALIENOR 9226-6F2: 65 % light peat, 20 % dark peat and 15 % perlite) and relocated in a controlled growth chamber under artificial lights (300 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) with an hemeroperiod of 16 h (from 6:00 am to 10:00 pm). The relative humidity was maintained between 65 to 80 % and temperatures were maintained at 20 °C and 18 °C

during day and night periods respectively. Watering was achieved 2 to 3 times per week with a complete nutrient solution (Liquoplant Bleu, Plantin, France) during 40 days. Plants and individual leaves, all identified by nodal rank according to their order of emergence were photographed before sampling. In addition non destructive measurements indicative of development progression (Albert *et al.*, 2012; Faës *et al.*, 2015; Bresson *et al.*, 2017) have been realized that were: chlorophyll content measured with a chlorophyll meter (SPAD-502, Konica Minolta, Tokyo, Japan), and the quantum efficiency of photosystems II (Fv/Fm) using a chlorophyll fluorimeter (Handy PEA, Hansatech Instruments, London, England).

2.5.2. Phloem exudate sampling for sap composition and proline loading measurements

Phloem sap composition was appreciated after petiole exudates were recovered by using the EDTA-facilitated method adapted from (Albert *et al.*, 2012). Briefly, plants were watered the day before sampling. Leaf petioles from selected leaves were cut and placed immediately in an EDTA solution (EDTA 20mM ; pH 7.0). Then the tips of the petioles were cut again under submersion into the solution to prevent the formation of air bubbles and immersed in 5 ml EDTA for 60 min in darkness at 20 °C and 80/90 % relative humidity (RH). After this equilibration period, petioles were rinsed and transferred in 5 ml of ultra-pure water for 18 h under darkness (20 °C ; 80/90 %RH) for exudate collection. Finally, leaves were discarded and exudates were frozen in liquid nitrogen, lyophilized and stored at -20 °C. Dried exudates were resuspended in 1 ml of ultra-pure water and 50 µl were used for amino acid analysis by UPLC-UV (see after). Collections were replicated three times from different plants. Proline (Pro)loading into the phloem has been evaluated by infiltration of standard Pro in attached leaf tissues. Infiltrations were performed on 8 independant plant, half with [¹⁵N]-Pro and the other half with [¹⁴N]-Pro. [¹⁵N]-Pro was then qualified and quantified in the phloem saps by mass spectrometry through M+1 Pro isotopolog evaluation and corrected from M+1 natural abundance determined from [¹⁴N]-Pro infiltrations. For one leaf assay, 100 µl of a 30 mM Pro water solution were loaded into a 1 ml syringe. Then, the leaf blade to infiltrate was delicately pierced with a needle at two points on both sides of the main vein at the apical third of the lamina. The Pro solution was the infiltrated by the two holes using the syringe. After 1 h, the leaf was cut from the plant at the petiole level and the phloem sap was then sampled as previously described.

2.5.3. Labelled proline infiltration in leaf explants for metabolic partitioning evaluation

Exogenous labelled proline incorporation was performed on leaf discs isolated from *B. napus* leaves collected at three different developmental stages (young, mature and senescing) by using vacuum infiltration. For each the three biological replicate, four series of three discs (\varnothing 1 cm) per leaf were cut and placed in a 24 wells plate (three discs per well) on 400 μ l of the infiltration medium (MES 10 mM ; Triton X-100 0.5 %) either enriched with [$^{13}\text{C}_5$]-Proline at 40 mM, (CLM-2260-0, Euriso-Top, Saint-Aubin, France) for the series 1 and 2, or with unlabelled Pro (P0380, Sigma-Aldrich, Missouri, Etats-Unis) for the series 3 and 4 (with Proline at 40 mM). The plates containing the explants were placed under vacuum for 1 min, repeated 3 times, in order to facilitate proline infiltration into the tissues. The incubation step was done under gentle stirring for 1 h, 2 h or 4 h at 22 °C either in complete darkness for series 1 and 3 or under 200 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ of light for series 2 and 4. After incubation, leaf discs were rinsed 3 times for 1 min with 5 ml MES (10 mM). Finally, leaf fragments were weighed, quenched in liquid nitrogen and grinded for 20 s at 30 Hz using a ball mill (TissueLyser II, Qiagen, Netherlands) before storage at -80 °C. After sampling of the leaf disks, leaves were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for RNA extraction.

2.5.4. Amino acid extraction, derivatation and analyses by UPLC-UV-MS

Amino acids extraction was performed by following the MTBE-based extraction procedure adapted from (Krueger *et al.*, 2014). The extraction mixture consisted of MeOH/MTBE (1:3) with β -Aminobutyric acid (BABA 400 μM) as internal standard. Extraction was performed by adding 1 ml of the cold extraction mixture to 10 mg of the frozen leaf explant powders, shaken for 30 min and followed by a sonication step (15 min at 4 °C). Phases separation was obtained by adding 650 μ l of $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (3:1) immediately vortexed for 1 min and followed by a 5 min centrifugation at 12 000 g and 4 °C. The lower, polar phase, was collected and stored at -20 °C before analyses. Amino acids (AAs) were analysed by UPLC-DAD-MS through the Waters kit reactant package (Waters Corporation, Milford, MA, USA), according to the method described by (Cohen and Michaud 1993), adapted by (Bouchereau *et al.*, 1999) and refined by (Renault *et al.*, 2010; Albert *et al.*, 2012). Briefly, 50 μ l of the polar extracts (or the phloem exudate samples) were evaporated with a Speed-Vac concentrator at 30 °C and resuspended in 50 μ l of MilliQ water. Then 5 μ l were mixed with 35 μ l of AccQ•Tag borate buffer and 10 μ l of AccQ•Tag reagent solution. The reaction

was conducted at 55 °C during 10 min and transferred in UPLC vials for analysis. Then 1 µl was injected into an Acquity™ UPLC BEH C₁₈ 1.7 µm 2.1 × 100 mm column (Waters) heated to 55 °C and eluted at a flow rate of 0.7 ml.min⁻¹. Amino acids were detected at 260 nm using a photodiode array detector. For each eluted amino acid, isotopologs were analyzed by mass spectrometry using the TQD detector (Acquity Water tandem quadrupole system with a Z-spray ionization source) under single ion recording (SIR) mode according to (Gaudin *et al.*, 2014). The content of individual amino acids was expressed in µmol.g⁻¹ of fresh weight after normalization with the internal standard and calibration with external calibration curves for individual amino acids. Isotopolog enrichment with [¹³C₅]-Pro were calculated from measured abundances after (1) subtracting natural abundance with samples infiltrated with [¹²C]-Pro and (2) normalizing by the percentage of labelled proline infiltrated. This last step compensates for the presence of unlabelled endogenous proline, which dilutes the incorporation of ¹³C.

2.5.5. RNA extraction, DNase treatment and reverse transcription

Extraction of RNAs from grounded frozen tissues was carried out with the NucleoSpin RNA Plus kit (#740984, Macherey-Nagel, Düren, Germany) adapted from the manufacturer's instructions. An additional centrifugation step (1 min, 11 000 g) was performed after adding the lysis buffer. The extracted RNAs were assayed using an ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop, Wilmington, DE, USA) and a Quantus Fluorometer (Promega, Madison, USA). To remove contamination by genomic DNA, 2 µg of total RNA were treated with RNase-free DNase I (EN0525, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) according to the manufacturer's instructions. The first strand cDNA was synthesized using 1 µg of DNA-free RNA with Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (M1701, Promega, Madison, USA) and oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Promega, Madison, USA) following the manufacturer's recommendations.

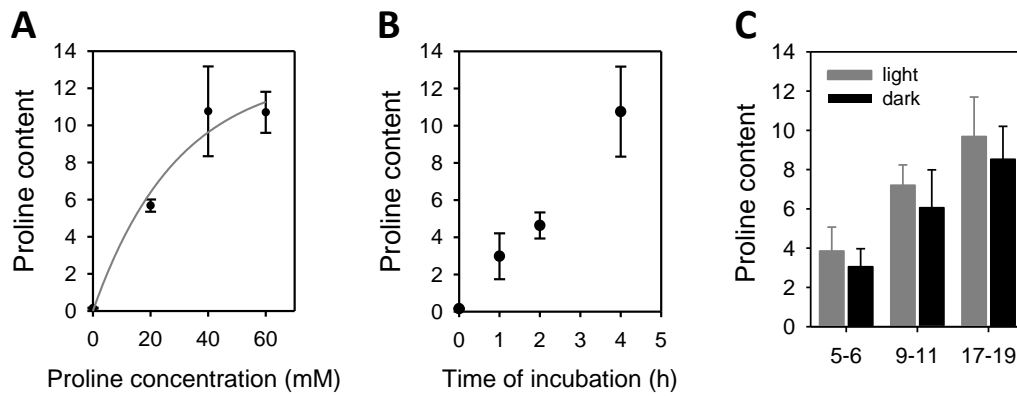
2.5.6. Real-time PCR quantification

Gene relative expression was carried out by qPCR as described by Faes *et al.* (2015) on a 15th dilution of the previously extracted cDNA. For each sample, 4 µl of cDNA were added to 5 µl of 2X Light Cyclers 480 SYBR Green I Master mix (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) and 1 µl of forward and reverse primer pairs (10 µM each). Amplification and quantification reactions were performed using a Light Cyclers 480 (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). The relative expressions of the targeted genes were normalized with

respect to the efficiency of the reaction and the expression of two constitutive reference genes *BnaX.PTB* (polypyrimidine tract-binding) and *BnaX.UBC21* (ubiquitin-conjugating enzyme 21). Because of sequences high similarity, *Brassica napus* ProDH1 homeologous copies from *B. rapa* (A) and *B. oleracea* (C) genomes were quantified together. Therefore, *BnaA&C.ProDH1a*, *BnaA&C.ProDH1b* and *BnaA&C.ProDH1.c* transcripts were all quantified together, while *ProDH2* transcripts *BnaA.ProDH2a* and *BnaC.ProDH2a* were quantified specifically.

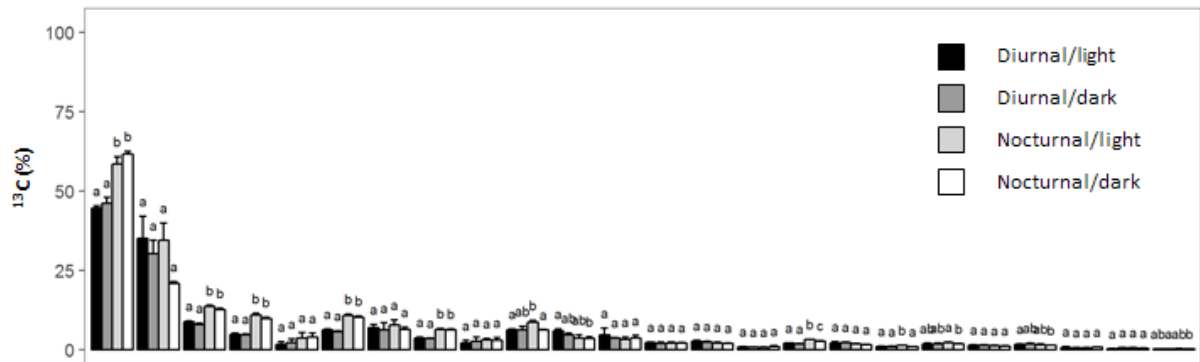
2.5.7. Statistical analyses

All data analysis were performed under R (3.4.1). Differences between groups were tested by using the Wilcoxon test with the packages “ggpubr” (0.1.6) and visualizations were created using “ggplot2” (2.2.1).

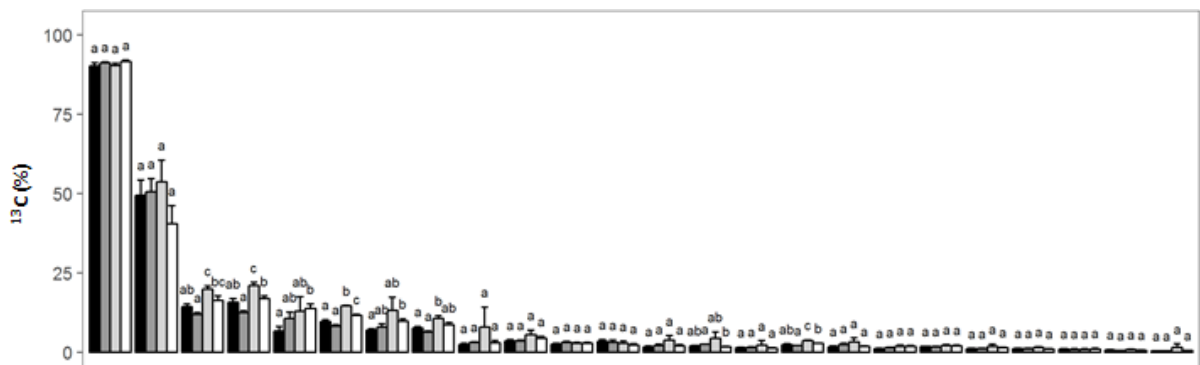


Supplementary data II-1: Proline content accumulation in foliar disks by increasing (A) proline concentration in the infiltration medium (from 0 to 60 mM) or (B) the incubation time from 0 to 4 h). Proline content in the three sample groups after infiltration with 40 mM of Pro during 4 hours under light or in dark conditions (C).

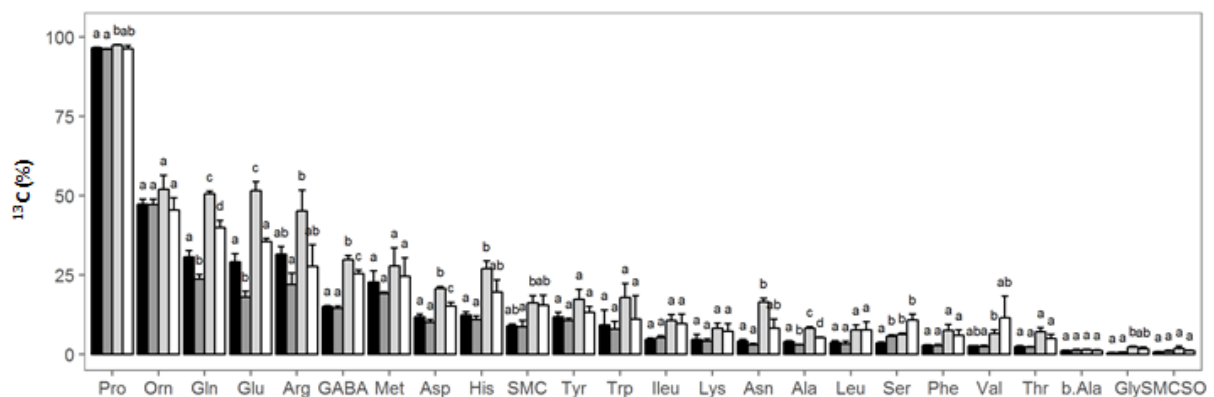
A Corrected percentage of ^{13}C after [^{13}C]-Pro incorporation in young leaf disks



B Corrected percentage of ^{13}C after [^{13}C]-Pro incorporation in mature leaf disks

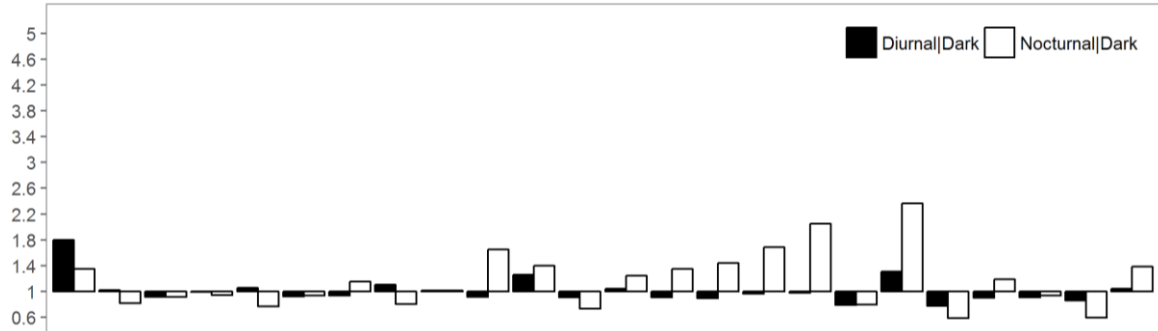


C Corrected percentage of ^{13}C after [^{13}C]-Pro incorporation in senescing leaf disks

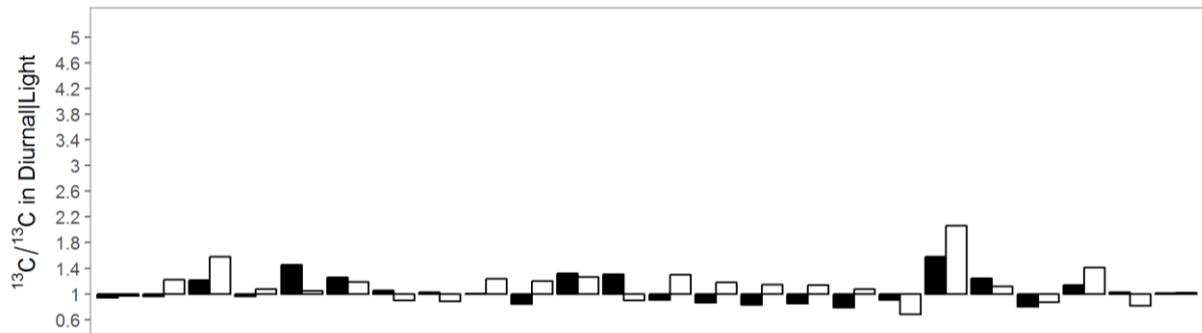


Supplementary figure II-2: Percentage of ^{13}C in free amino acids of young (A), mature (B) and senescing (B) leaves after incorporation of [$^{13}\text{C}_5$]-Proline at 40 mM for 4 h in leaf disks. Incorporations were done under light or dark conditions on diurnal and nocturnal leaves. Error bars represents the IC95 and different letters represents *p-value* below 0.05 (Wilcoxon test of 3 biological replicates).

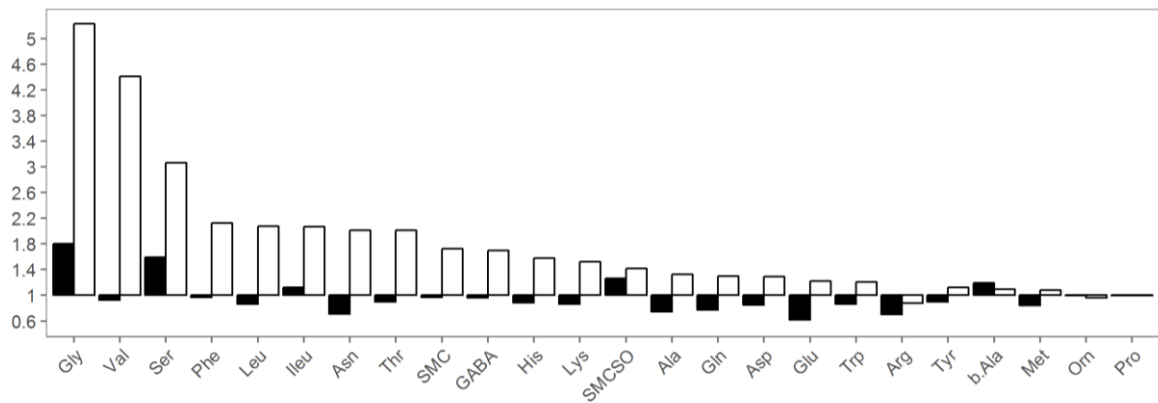
A Ratios of ^{13}C incorporated in young leaves over diurnal disks infiltrated under light



B Ratios of ^{13}C incorporated in mature leaves over diurnal disks infiltrated under light



C Ratios of ^{13}C incorporated in senescing leaves over diurnal disks infiltrated under light



Supplementary figure II-3: Normalized incorporation ratios of ^{13}C in young (Y), mature (M) and senescing (S) leaves disks infiltrated with [$^{13}\text{C}_5$]-Pro under light in nocturnal leaves or dark in nocturnal and diurnal leaves, over diurnal leaves infiltrated under light.

CHAPITRE 3

VARIATIONS GÉNOTYPIQUES DU MÉTABOLOME ET DU TRANSCRIPTOME AU COURS DES PROCESSUS FOLIAIRES DE REMOBILISATION TROPHIQUE PENDANT LA PHASE REPRODUCTRICE DU COLZA DANS DIFFÉRENTS CONTEXTES DE FERTILISATION AZOTÉE

1. Introduction

2. Metabolomic and transcriptomic signatures of nitrogen deficiency and nitrogen remobilization efficiency in two oilseed rape genotypes (Article)

CHAPITRE 3 : VARIATIONS GÉNOTYPIQUES DU MÉTABOLOME ET DU TRANSCRIPTOME AU COURS DES PROCESSUS FOLIAIRES DE REMOBILISATION TROPHIQUE PENDANT LA PHASE REPRODUCTRICE DU COLZA DANS DIFFÉRENTS CONTEXTES DE FERTILISATION AZOTÉE

1. Introduction

Les deux chapitres précédents font mention, sur les plans structural et fonctionnel, des ajustements métaboliques qui opèrent, dans l'espace et dans le temps, au cours du développement des tissus végétatifs chez le génotype Aviso de colza. L'attention a été surtout portée à la définition des voies, des réseaux et des effecteurs métaboliques qui soutiennent le fonctionnement des tissus foliaires puits, sources et surtout les processus de remobilisation des nutriments carbonés et azotés pendant la progression de la sénescence séquentielle. L'analyse, déjà sophistiquée, s'est malgré tout cantonnée à un contexte génétique, cultural, développemental et environnemental très circonscrit en privilégiant un seul génotype, cultivé en conditions contrôlées et de confort nutritionnel (lumière, azote et eau notamment). Il apparaissait donc indispensable, dans le cadre de ces travaux de thèse, d'élargir le champ d'investigation du phénotypage métabolique de l'EUA et plus particulièrement de l'ERA. Depuis une dizaine d'années, dans le cadre des programmes successifs soutenus par l'ANR, que l'équipe d'accueil coordonne, comme « Genergy » et aujourd'hui « Rapsodyn » (<https://www.rapsodyn.fr/>), l'analyse génétique, écophysiological, physiologique et moléculaire de l'EUA, chez le colza, exploite largement les ressources génétiques disponibles (lignées, populations en ségrégation, populations NAM) ainsi que les capacités à expérimenter dans différentes situations contrôlées, semi-contrôlées et au champ et dans différents contextes de fertilisation azotée. Afin d'enrichir

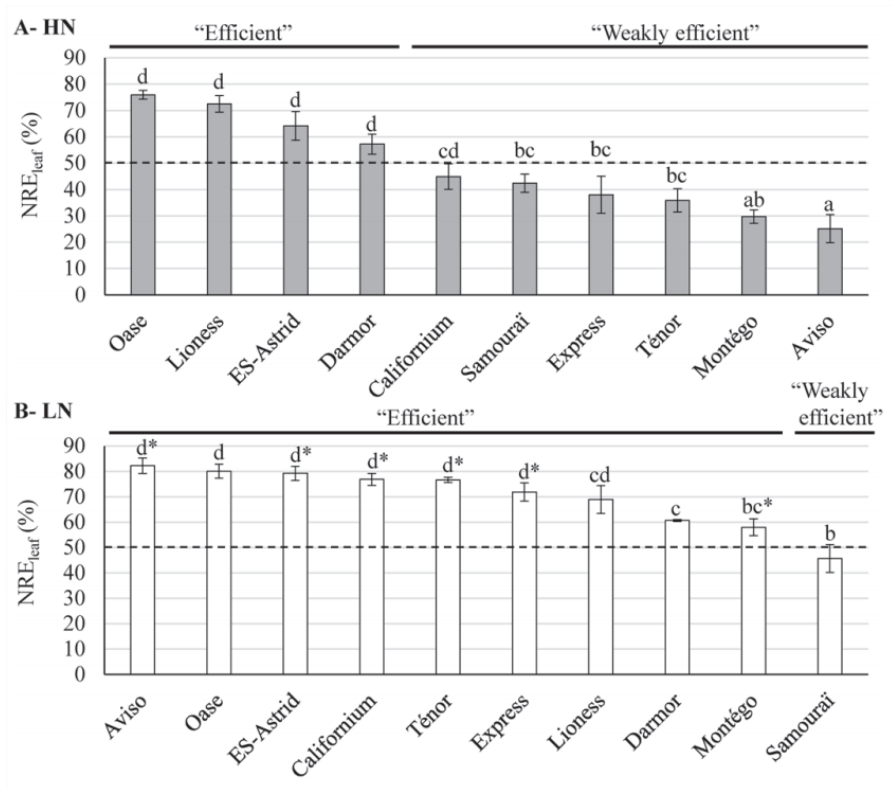


Figure III-1 : Efficacité de remobilisation du N foliaire à partir d’une feuille source chez 10 géotypes de colza en conditions de N pléthoriques (HN : 3,75 mM de nitrate ; A) et limitantes (LN : 0,375 mM de nitrate ; B). Les données correspondent à la diminution du contenu en N pendant les 21 jours de l’expérience par rapport au contenu initial mesuré à la date d’application du stress (jour 0). Les géotypes ont été classés comme « efficace » s’ils le pourcentage de diminution est supérieur à 50 % (représenté par la ligne pointillée) et « faiblement efficace » dans le cas contraire (d’après *Girondé et al.*, 2015).

nos données de chémotypage et de phénotypage moléculaire et de questionner l'efficacité de remobilisation de l'azote en terme de variabilité génétique et de réponse au niveau de nutrition azotée de la plante, une étude combinant des données de transcriptomique et de métabolomique comparant le fonctionnement de tissus foliaires en sénescence, pendant la phase de reproduction, chez deux génotypes et dans deux situations, pléthorique et déficitaire de fertilisation azotée. Cette étude s'appuie sur un premier jeu de données acquises au cours d'une expérimentation conduite à Caen par l'UMR EVA dans le cadre des opérations collaboratives évoquées précédemment. L'approche consistait à évaluer les performances d'utilisation de l'azote de 10 génotypes de colza, en conditions semi-contrôlées, au stade végétatif sous deux régimes de nutrition azotée (Girondé *et al.*, 2015a). En étudiant des paramètres physiologiques liés aux processus de NRE chez ces dix génotypes de colza, les auteurs ont mis en évidence des comportements contrastés dépendants des variétés, des niveaux d'approvisionnement en nitrate et de l'interaction entre les deux. Deux génotypes révèlent notamment des performances très différenciées, Oase et Aviso (figure III-1)(Girondé *et al.*, 2015a). Pendant la phase végétative de croissance, ces deux variétés présentent de très bonnes performances de production de biomasse et une NUE élevée en condition d'alimentation azotée non limitée. En revanche, ils se distinguent par une NRE foliaire différenciée, avec seulement 25 % du N remobilisé pour Aviso contre 75 % pour Oase (figure III-1). Aviso est donc qualifié de faiblement efficace (en terme de capacité de remobilisation) en condition d'alimentation élevée en azote et Oase d'efficace. En condition limitante en nitrate, Oase connaît une diminution sévère de biomasse foliaire (-45 %) comparé à Aviso (-8 %). Oase, à ce stade végétatif, apparaît donc sensible au stress azoté, alors que Aviso est plutôt tolérant. Cette différence est expliquée par une augmentation importante de la NRE chez Aviso (+70 %) en condition limitante par rapport à Oase (+6 %) (figure III-1). Aviso est donc apte à moduler les processus liés à la NRE de manière très efficace. Une deuxième expérience a été conduite, de manière à comparer les deux génotypes sur un cycle complet de développement, en conditions semi-contrôlées, lors d'un aménagement de conditions d'apport en nitrate (non limitant et limitant) pendant la phase de montaison et de début de floraison (Girondé *et al.*, 2015b). Ce qui ressort de cette étude, et l'utilisation des techniques de marquage ¹⁵N, c'est que, pendant la phase de remplissage des grains, dans les deux régimes azotés, Oase privilégie l'allocation d'azote nouvellement absorbé vers les graines alors qu'Aviso favorise les fonctions de recyclage à partir des feuilles et des tiges. En terme de rendement final, les deux génotypes sont pénalisés par la carence en azote, l'indice de récolte en azote étant malgré tout plus important chez Aviso en relation avec des capacités de remobilisation

plus performantes avant l'initiation du remplissage des siliques et possibilité de stocker transitoirement de l'azote organique dans les tiges pour compenser l'asynchronie entre le déchargement des feuilles et la formation des fruits et des graines. L'efficacité de la remobilisation d'azote organique, notamment à partir des tissus foliaires sources est associée aux performances de la protéolyse, montrée dans l'étude comme supérieure chez Aviso par rapport à Oase (Girondé *et al.*, 2015b).

Ce sont donc les feuilles dites sources des deux génotypes, collectées durant cette dernière expérimentation, au stade montaison et soumises aux deux régimes d'alimentation en nitrate qui ont été analysées ici 0, 7, 14 et 21 jours après le traitement azoté au moment où sont engagés plus ou moins efficacement (et différemment selon les deux génotypes) les processus de recyclage des nutriments. Nous avons procédé à une analyse comparée de la fraction polaire du métabolome et du transcriptome pour tenter de décrypter les réseaux géniques et métaboliques mobilisés à ce stade et établir les éléments de distinction entre les deux génotypes et l'incidence de la carence en azote. Un regard plus attentif a été porté au phénotypage moléculaire du génotype Aviso de manière à apporter des éclairages complémentaires aux études rapportées dans les chapitres précédents. Les résultats et leur analyse sont restitués sur le format d'une publication mais le traitement de l'information reste encore très incomplet, eu égard les contraintes de temps, et se devra d'être renforcé afin de produire un document abouti et publiable.

2. Metabolomic and transcriptomic signatures of nitrogen deficiency and nitrogen remobilization efficiency in two oilseed rape genotypes

Sylvain DECHAUMET¹, Mathilde ORSEL¹, Françoise LE CAHEREC¹, Marie Françoise NIOGRET¹, Vanessa CLOUET¹, Nathalie MARNET³, Catherine JONARD¹, Solenne BERARDOCCO¹, Antoine ESCOURROU², Yann GUITTON², Alexandra GIRONDE⁴, Jacques TROUVERIE⁴, Philippe ETIENNE⁴, Jean-Christophe AVICE⁴, Nathalie NESI¹ and Alain BOUCHEREAU¹

¹ INRA, UMR 1349, Institute for Genetics, Environment and Plant Protection (IGEPP), UMR INRA-Agrocampus Ouest-Université de Rennes 1, 35653 Le Rheu cedex, France

² Oniris, LUNAM, Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), BP 50707 - 44307 Nantes Cedex 3, France

³ UR117 INRA, Cidricoles Biotransformation des Fruits et Légumes, BP 35327, 35653 Le Rheu Cedex, France

⁴ UCBN, UMR INRA–UCBN 950, Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France

Abstract

• **Introduction:** Winter oilseed rape is characterized by high nitrogen needs attributed to low nutrient remobilization (NRE) performances during source leaf ageing. Those nutrient recycling, partitioning and allocation processes are under complex networking regulation that should be studied and clarified to highlight genetic levers for breeding towards overall nitrogen use efficiency improvement in this major oilseed crop.

• **Objectives:** The study aimed at unravelling key molecular effectors and regulators linked to nutrient recycling efficiency in source leaves during the reproductive stage of growth and seed yield elaboration.

• **Methods:** We selected two different nitrogen use efficient genotypes and analysed their respective source leaf metabolome and transcriptome signatures during senescence progression under contrasted nitrogen supply regimes. A single objectified source leaf was sampled and profiled between bolting and flowering stages of plant growth. We had recourse to transcriptome profiling by custom microarray chip technology along with metabolome fingerprinting through untargeted high-resolution mass spectrometry procedures. Canonical correlation analysis were used to refine and link gene and metabolite regulation networks.

- **Results:** Most evident variations between the two genotypes were found around their protease activities and/or their amino acid, carbohydrate and nitrate transporters. Distinct homolog genes were shown to be specific to each genotype and differentially regulated during leaf development, although nitrogen remobilization performance looked efficient in both genotypes. Sets of metabolite features were found to be strongly linked to transcript clusters under the increasing NRE observed in Aviso genotype when exposed to nitrogen deficiency.
- **Conclusion:** Key molecular and metabolite markers of NRE in source leaves during yield elaboration in oilseed rape have been highlighted. The relevance of these markers has been confronted with genetic polymorphism, evolution of plant development and abrupt changes in nitrogen nutrition conditions.

2.1. Introduction

Winter oilseed rape (*Brassica napus L.*) is the main European oil crop, grown for its seeds which are extracted to produce edible oil, biofuel and protein meal. It is a very high nitrogen (N)-fertilizer consuming species (up to 200 kg.ha⁻¹) characterized by a rather low N use efficiency (NUE). Indeed, only 50 to 60 % of the N applied is recovered in seeds at harvest time (Schjoerring *et al.*, 1995). Therefore, oilseed rape production is suffering significant N-imbalance leading to economic, energetic and environmental penalties. As such, reducing N-fertilizer usage while minimizing the impact on yield is essential to its sustainability (Avicé and Etienne, 2014; Bouchet *et al.*, 2016). To meet these requirements, improving NUE is necessary. The NUE results from three physiological processes: the uptake efficiency (NUpE), the assimilation efficiency (NAE) and the remobilization efficiency (NRE) (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010; Avicé and Etienne, 2014). Despite its high capacity for mineral N absorption from soil, the NRE within the plant is considered inefficient. Indeed, during seed development, the NUpE is limited and seed filling rely mainly on the endogenous N stored in stem and leaves. While leaves account for most of the N remobilized, there is significant residual N remaining at their fall (Rossato *et al.*, 2001). Therefore, the optimisation of leaf NRE is a determining step to increase NUE, especially under limited N input. A possible way to increase NUE by genetic and genomic selection is to identify the different mechanisms involved between efficient genotypes and try to combine them more optimally.

Leaf NRE is closely related to its developmental and environmental-induced ageing and more specifically to senescence. As the ultimate developmental phase of leaves leading to

their death, leaf senescence is finely regulated at the molecular steps (Penfold and Buchanan-Wollaston, 2014; Koeslin-Findeklee *et al.*, 2015). It is accompanied by cellular and biochemical processes leading to the dismantlement of subcellular structures and macromolecules associated with the active translocation of resulting catabolites to sink tissues (Avila-Ospina *et al.*, 2014; Havé *et al.*, 2017). To provide both exportable N-forms and energy to maintain ongoing processes since photosynthetic machinery is degraded, the metabolism needs to be finely tuned, in and between source and sink tissues (Watanabe *et al.*, 2013; Chrobok *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017; Clément *et al.*, 2018)). In consequence, the integration of transcriptomic and metabolomic data is useful to grasp the complex mechanisms underlying the remobilization processes during leaf senescence. Combinatory omic approaches have been greatly improved during the last decade (Cavill *et al.*, 2016; Krumsiek *et al.*, 2016), allowing to link complex regulatory processes to traits or phenotypes of interest as demonstrated in the model specie *A. thaliana* (Hirai *et al.*, 2004; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2014). Oilseed rape genome has a long history of duplications and mergers, resulting in structure and function redundancies and evolution and making genomic and transcriptomic approaches more complex. They have been more accessible since the first full-genome assembly (Chalhoub *et al.*, 2014) and the transcriptomic regulation of *B. napus* leaf senescence and nitrogen starvation have been recently reported (Koeslin-Findeklee *et al.*, 2015; Safavi-Rizi *et al.*, 2018). Up to date, only very few studies employed either a targeted (Clément *et al.*, 2018) or untargeted (Dechaumet *et al.*, submitted) metabolomic approach to decrypt metabolism reconfiguration during *B. napus* leaf senescence and were conducted during the vegetative stage. In tobacco, a recent study combined both approaches to decipher remobilization processes during leaf senescence (Li *et al.*, 2017).

We have contributed to a recent experiment dealing with genotypic variability of NUE and NRE traits among ten oilseed rape genotypes during the vegetative phase of plant growth (Girondé *et al.*, 2015a). Authors have highlighted four different responses to high (HN) and low (LN) N inputs (Girondé *et al.*, 2015a). All groups were efficient and productive enough under HN but showed differences under LN: group 1 and 2 were characterized by a reduced leaf growth associated with a decrease of leaf NRE in the second group; group 3 and 4 showed an increase of NRE but not sufficient to sustain biomass production in the case of group 3. Two genotypes (Aviso, group 1 and Oase, group 4), highlighted to have different strategies following the nitrate limitation at the vegetative stage, were selected for another experiment to identify the physiological traits

involved in the high NUE and NRE in restricted N supply conditions, at the whole plant cycle (from bolting to mature seeds) and cellular levels (Girondé *et al.*, 2015b). Long term pulse-chase ^{15}N -labelling was performed to precisely define the endogenous and exogenous N fluxes at the whole plant level between the bolting and mature seed stages, under restricted and ample nitrate supply. A specific ^{15}N -labelling was also used in order to determine a relevant estimation of NUE and its different components (NUpE, NUtE and NRE). N status and proteolytic performance of source leaves between the bolting and flowering stages have also been addressed. The findings suggested that an efficient leaf NRE was mainly associated to (i) a high proteolysis by the cysteine proteases and proteasome system and (ii) a strong coordination between proteolysis, the export/degradation of oligopeptides and the export of amino-acids (Girondé *et al.*, 2015b).

To get a deeper understanding of molecular networking driving recycled nutrient partitioning and allocation in source-functioning leaves, the plant material and the experimental design described above have been valorized here to combine a targeted and untargeted metabolomic investigation with highthroughput transcriptomic data.

2.2. Results and discussion

In order to investigate the metabolic and regulatory components involved in nutrient recycling processes between two contrasted N-valorization genotypes, we have used the same plant material as Girondé *et al.* (2015b). To this end, a single leaf, objectified as a source between bolting and flowering, has been followed during the progression (7, 14 and 21 days after treatment) of its monocarpic senescence under either high nitrate (HL) or low nitrate (LN) fertilization conditions. Transcriptomic and metabolomic profiling data acquisition have been performed through DNA microarray analysis of transcript production and high-resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS) profiling of the polar metabolite fraction of leaf extracts. For both sets, data were filtered to keep only relevant gene probes and metabolic features, enabling 3 455 annotated gene expression levels and 1 172 metabolic features aggregated to 38 targeted metabolite contents to be considered (see material and methods). The resulting refined raw data were processed and combined by multivariate and correlation analysis (PCA and CCA).

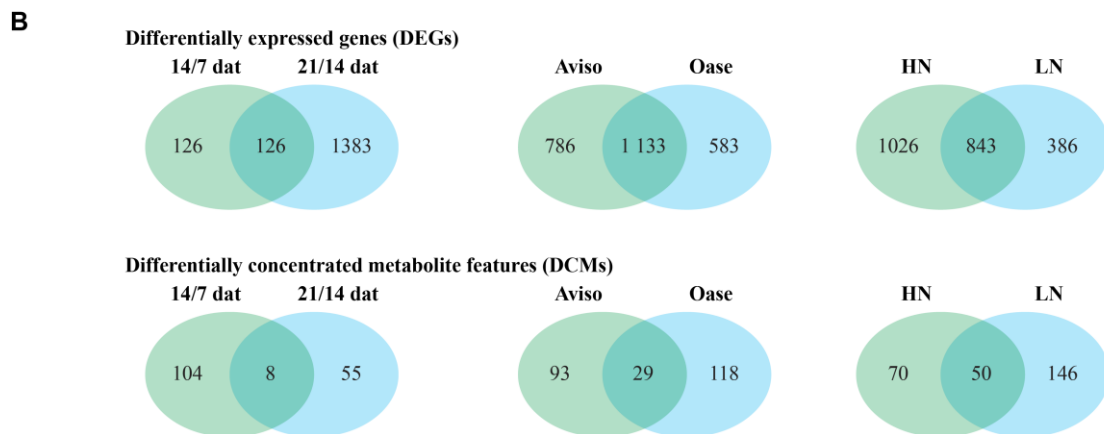
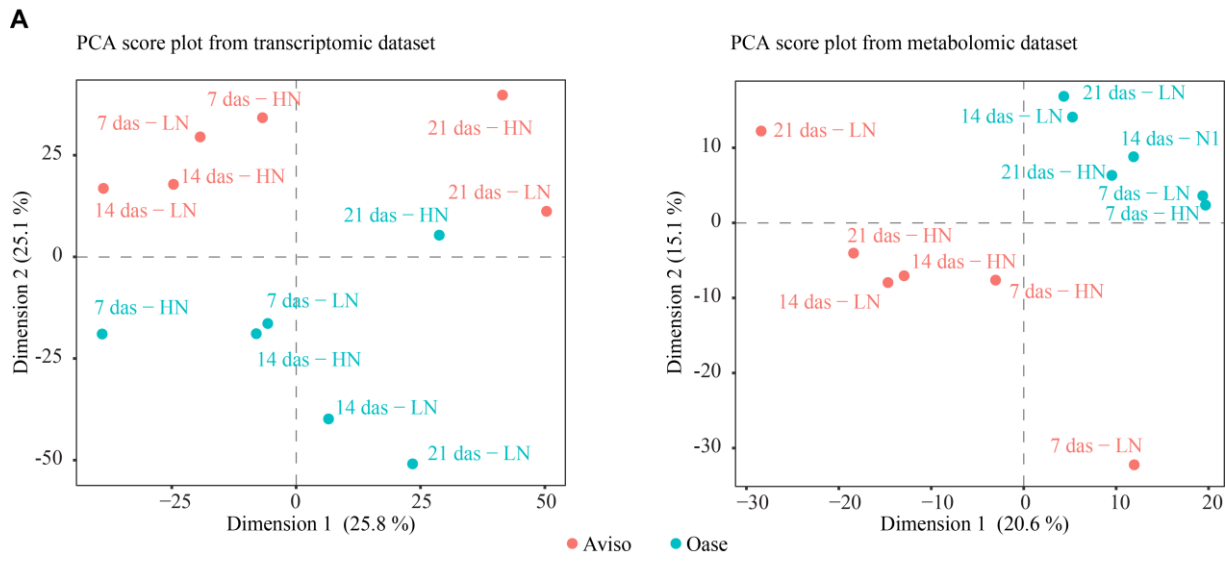


Figure III-2: Metabolome and transcriptome feature variations observed in senescing leaves of two oilseed rape genotypes between bolting and flowering periods under two nitrogen-fertilization regimes. **A:** Score plots of principal component analysis (PCA) from transcriptomic data (left) and metabolomic data (right); each point represents the mean profile of the four biological replicates. **B:** Venn diagrams of differentially expressed genes (DEGs) (top) and differentially concentrated metabolites (DCMs) (bottom) according to senescence progression (14/7 and 21/14 days after treatment (dat)), between both genotypes (Aviso and Oase) and between high (HN) and low nitrogen (LN) supplies (genes and metabolites features with p -value < 0.05 with t test after fdr correction were selected ; N = 4).

2.2.1. Metabolome and transcriptome reconfiguration overview

During the time of leaf ageing progression, distinct modifications were observed on the transcriptome expression profiles and the metabolome signatures according to the considered genotype and the N treatment. As a matter of fact, genotypes and developmental stages could be easily differentiated by PCA with both approaches (figure III-2A). The first dimension describes the developmental stages and account for 25.8 % and 20.6 % of the the total variance for the transcriptomic and the metabolomic data respectively whereas the second dimension discriminates between the two genotypes and account for 25.1 % and 15.1 % of the global data set variance (figure III-2A). Under this global chemometric analysis, N treatment discrimination is more subtle. Therefore, despite proven remobilization activities in both genotypes, at the considered development period, these results confirm that Oase and Aviso have distinct molecular patterns of reaction. That is further confirmed by the overall profile of differentially expressed genes (DEGs) between the two genotypes (figure III-2B) where 1 133 DEGs were common, while 786 and 583 were specific to Aviso and Oase respectively. These variations were also pointed out from differentially concentrated metabolite features (DCMs) where 29 analytes were common to both genotypes, while 93 and 118 were specific to Aviso and Oase respectively. Accordingly to what has been reported by Safavi-Rizi *et al.* (2018), the number of affected genes increased as the leaf aged, from 252 to 1 509 DEGs (between 7 and 21 days), from which 126 where common between both genotypes, between 14/7 days after treatment (dat) and 21/14 dat (figure III-2B). Most DCMs were observed at 14 dat (112 against 63 at 21 dat with 8 in common). For these reason, it is expected that the genotypic differentiation increased during the developmental stages and potentially led to different physiological responses at later periods as revealed by Girondé *et al.* (2015b). In the same way, gene expression levels were affected by N supply, with 843 common DEGs between both conditions, 1 026 and 386 specific to HN and LN respectively whereas most DCMs were observed in LN (146) compared to HN (70) with 50 in common.

2.2.2. Genotypic distinctions of gene expression and metabolic adjustments during leaf senescence under high nitrogen conditions

To identify the processes responsible for the differential expression patterns leading to a comparable NRE, we compared Oase to Aviso in terms of transcriptomic and metabolomic responses under HN. The count of up/down DEGs and DCMs between the two genotypes (in blue on figure III-3A) reveals an increase of the metabolomic divergence and a decrease

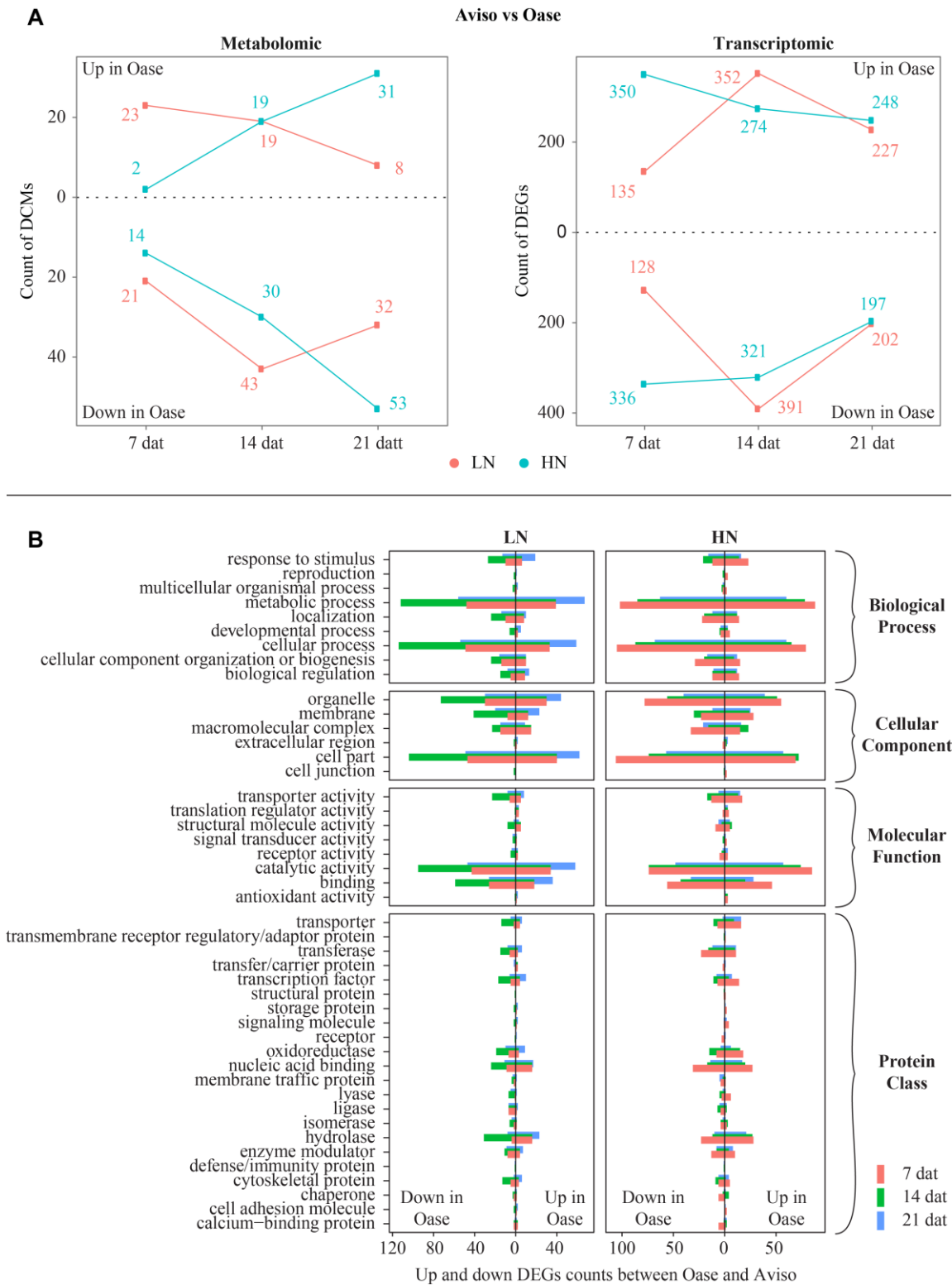


Figure III-3: Metabolome and transcriptome feature variations observed between Oase and Aviso during leaf senescence progression under two nitrogen fertilization regimes. Variations of the number of up/down DEGs and DCMs between both genotypes during the three stages senescence evolution for HN and LN conditions (A). Functional classification by GO Term enrichment of those DEGs (B). Only DEGs and DCMs with a $\log_2(\text{ratios})$ below -0.7 or above 0.7 were kept after t test with *fdr* correction selection on 4 biological replicates.

of transcriptomic divergence over the time of senescence progression. At 7 dat, only 2/14 (up/down) DCMs were observed in Oase compared to Aviso and 350/336 (up/down) DEGs whereas at 21 dat, 31/53 DCMs and 248/197 DEGs were identified. Carbohydrates are found among the down DCMs in Oase (i.e. Sucrose, Glucose, Fructose and Myo-inositol) as well as amino acids (i.e. α -Alanine, Serine and Threonine). Those compounds are known to be mobilized during senescence and Sucrose has been shown to display a similar profile of accumulation before the onset of developmental senescence (Dechaumet *et al.*, submitted). Therefore, the higher contents measured in Aviso could be explained by lower capabilities to export those metabolites or higher ones to produce them, more likely from degradative processes. The molecular functions involved in those differences were investigated by functional classification of the DEGs (right panel on [figure III-3B](#)). Genotypes displayed high dissimilarities in metabolic and cellular processes linked to organelles, membrane and cell structures as well as in functions of transport, catalytic and binding activities. The protein classes the most up-regulated in Oase compared to Aviso are transporters, oxidoreductases and hydrolases with 30 up-DEGs presenting high homology to transporters in Oase and 18 in Aviso with 6 in common. Interestingly, from the transporter-related transcripts specifically induced in Oase, three homologs with amino acids transporters ([supp. table III-I](#)): *LHT2* (*AT1G24400*), *PROT1* (*AT2G39890*) and one vacuolar amino acid transporter: (*AT2G39130*), two nitrate transporters *NPF3.1* (*AT1G68570*) and *NPF6.3* (*AT1G12110*), one UDP-galactose transporter (*AT4G23010*) and a polyol transporter *PLT5* (*AT3G18830*) known to transport multiple hexoses from which glucose, fructose and myo-inositol were found in this class. Those could be involved in the lower carbohydrate and amino acid contents found in Oase. An induction was also observed of an homolog copy to the cytosolic Glutamine Synthetase 1 (*AT5G53460*) and multiple proteases: 19 in Aviso, 24 in Oase ([supp. table III-II](#)). In regards to the decrease of amino acids and non-structural sugars concomitantly with the activation of peptidases and transports systems, it is reasonable to suppose that Oase and Aviso NRE capacities are related to an efficient management of degradation mechanisms from different proteases homologs. Furthermore, more transport systems are sollicitated in Oase which could participate to the decreases of metabolites observed. However, whether these proteases and transporters are directly involved in N remobilization remains to be checked.

2.2.3. Genotypic variation in the mechanisms involved in NRE under low nitrate

To identify the processes responsible for the differential expression patterns leading to NRE under LN, transcriptomic and metabolomic responses of Oase and Aviso were compared under these conditions. The count of up/down DEGs and DCMs between the two genotypes (in red on [figure III-3A](#)) reveals that the transcriptome profile between both genotypes was very similar at 7 dat but diverged as the stress impact evolved, from 135/128 (up/down) DEGs in Oase at 7 dat to 352/391 (up/down) DEGs at 14 dat and 227/202 (up/down) DEGs at 21 dat. Concurrently metabolite features diverged at 7 and 14 dat with 23/21 (up/down) DCMs and 19/43 (up/down) DCMs respectively but converged at 21 dat with 8 up DCMs and 32 down DCMs in Oase. As already observed under HN conditions, carbohydrate contents were lower in Oase, but only at 7 dat. The main functional divergences between the two genotypes were revealed by GO-term enrichment analysis (left on [figure III-3B](#)) and showed the higher variance at 14 dat with genes linked to transporter, catalytic and binding activities. In fact, most transporter ([supp. table III-D](#)) and catalytic activity-related genes ([supp. table III-II](#)) were down regulated in Oase in contrast to Aviso. In Aviso, four amino acid transporter transcripts were induced (*AAP3: AT1G77380*, *LTH2: AT1G24400*, an *LTH-like: AT1G25530* and a vacuolar transporter: *AT2G39130*) along with 4 carbohydrate transporters (*PLT5: AT3G18830*, *STP7: AT4G02050*, *ERD6-like4: AT1G19450* and *ERD6-like6: AT1G75220*). In contrast, Oase transcriptome revealed induction of transport activities involving two nitrate transporters, *NPF3.1* (also induced under HN) and *NPF8.3 (AT2G02040)* along with a sugar transporter (*STP7: AT4G02050*). This reveals that if some genes are common to HN condition (*STP7* and *NPF3.1*), there are also some divergences in the transport systems mobilized between the two genotypes although both are concerned by remobilization processes. Similar remarks can be done when considering protease-related gene expression, with 11 serine-, 9 cystein- and 2 aspartic- proteases induced in Aviso and 6 serine-, 9 cystein-, 2 aspartic- and 2 metallo- proteases induced in Oase, all corresponding to different homolog or gene families between the Aviso and Oase.

2.2.4. Canonical correlation analysis to unravel metabolic and molecular processes related to the low N response in Aviso

As highlighted above, the modulation of gene expression profiles between the two genotypes were highly divergent despite objectified nutrient remobilization dynamics in corresponding source leaves. To refine the molecular processes linked to NRE modulation

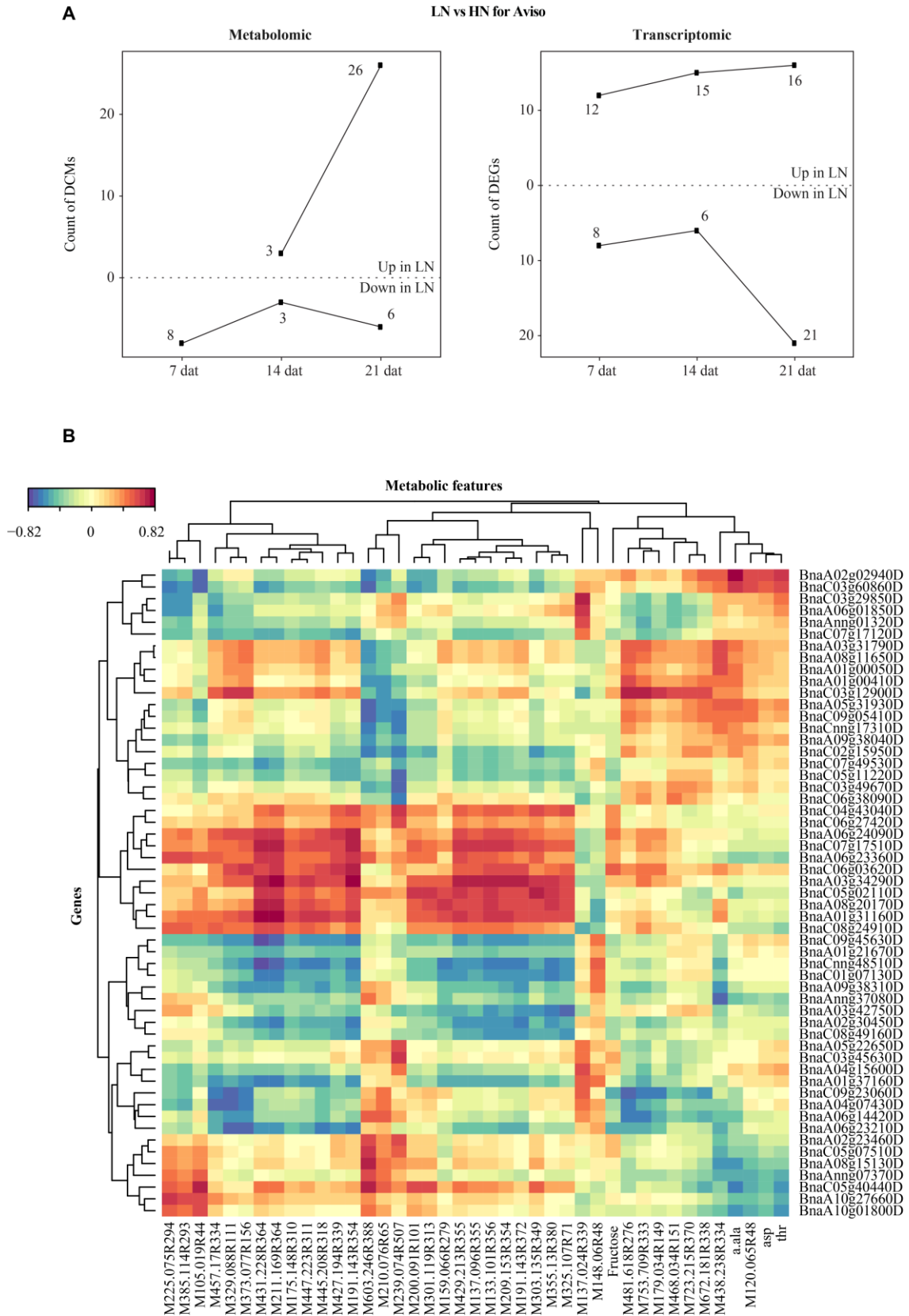


Figure III-4: Metabolome and transcriptome feature variations observed in Aviso during leaf senescence progression under two nitrogen fertilization regimes. DEGs and DCMs between N treatments for three developmental times (A). Correlations between metabolomic features and transcript levels from canonical correlation analysis (B).

and depict corresponding metabolomic fingerprints, we addressed the correlative analysis between metabolomic features and transcriptomic profiles in Aviso cultivated under HN and LN, since treatment has clearly demonstrated to boost NRE (Girondé *et al.*, 2015b). As such, the number and identity of DCMs and DEGs between both conditions were compared (figure III-4A). Surprisingly a very low number of DCMs and DEGs were identified between LN and HN but their number increased over the leaf development. There were only 8 down DCMs at 7 dat under LN, 3/3 (up/down) DCMs at 14 dat and 26/6 (up/down) DCMs at 21 dat. On the opposite, down DEGs increased over the time of the experiment with 12/8, 15/6 and 16/21 DEGs at 7, 14 and 21 dat respectively. Compared to HN, Fructose content was decreased in LN at 7 dat, as well as α -Alanine, Aspartate and Threonine at 21 dat. Lower contents of those compounds could be linked to activated remobilization processes as described above. Next we tried to link the metabolic and transcriptomic features to extract the genes directly correlated with metabolic variations by using a canonical correlation analysis. This method aims at highlighting correlations between two dataset and was used to extract the relevant correlations between genes expression and metabolic contents. As observed on the correlation heatmap (figure III-4B), clear cluster of positive and negative correlations are visible. For instance, the three amino acids (α -Alanine, Aspartate and Threonine) shows similar correlation with the selected genes. Interestingly, they are positively correlated to *BnaA05g31930D* which is an homolog to *AT3G05230* coding a Peptidase Signal Complex Subunit 3 which is putatively suspected to remove signal peptide from proteins as they are targeted to the endoplasmic reticulum (ER). Whether this gene expression is linked to senescence processes has not been demonstrated, neither if its expression levels is directly linked to amino acids increase but it seems that its expression is decreased concomitantly with the lowering of those three amino acids in Aviso. Other clusters are linked to non-identified metabolite compounds which are putatively relevant markers to target NRE efficiencies under LN and HN. However, functional annotation should be realized to confirm their identity by using mass fragmentation or NMR.

2.3. Partial conclusion

In conclusion, this preliminary analysis highlights the fact that nutrient remobilization processes operating efficiently during leaf senescence evolution at bolting stage may involve different molecular networks into close genetic backgrounds demonstrated to display divergent NUE at the later stages of plant growth cycle. Our results demonstrate

the variability in how both genotypes handle nitrogen and carbon metabolism, through distinctive expression profiles. We identified gene and metabolic markers relevant to describe efficient remobilizing processes. Among the most egregious molecular processes in our analysis proteolytic and transport activities were pointed out as functions logically very committed during the progression of leaf senescence and can mobilize different actors according to the genotypes. Since most of the transporter-related genes were linked to amino acid and sugar translocation those markers seems relevant. The nature of the genes associated with proteases highlights the mobilization of several families, quite different according to the two genotypes, and which will have to be related to the proteins themselves and their corresponding activities. Interestingly, Oase was characterized under high and low nitrogen supply by a lower content of carbohydrates and amino acids temporally associated to the induction of a polyol transporter (*PLT5*) and multiple amino acid transporters. A similar scenario has been observed between N treatments for Aviso. Since senescence processes are subjected to transcriptional, post-transcriptional, traductional and post-traductional regulation, a more in depth approach is needed to confirm the contribution of those markers to remobilization processes. We also found high correlations between a set of genes and metabolic features which are most likely involved in the activation of Aviso NRE observed between high nitrogen and low nitrogen treatments. However, at the moment, most of the compounds highlighted here are not annotated although they can constitute very serious candidates definite the optimization of nutrient recycling performances in leaf tissues. Therefore a structural characterization by mass fragmentation and/or NMR is needed to provide more informations on their potential functions. In order to strengthen and propose strong reusable markers of NRE, a broader study including more genotypic diversity is needed. The inclusion of weakly efficient genotypes as well as multiple cultural systems and environmental conditions will provide more robust markers probably linked to more specific functions.

2.4. Material and Methods

2.4.1. Plant materials

The same plant material as described in Girondé *et al.* (2015) was used. Briefly, two genotypes of winter oilseed rape (*Brassica napus L.* cv. Aviso and Oase) were cultivated in a greenhouse for two months followed by a vernalization period of 2 months (day: 10 h/10 °C ; night: 14h/4 °C). During this period, plants were supplied with 25 % Hoagland solution and the top of the canopy was maintained under a PAR (photosynthetically active

radiation) of 400 μmol of $\text{photon}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. Afterwards, plants were cultivated in individual pots at 40 plants per square meter and exposed to a thermoperiod of 20 °C/15 °C (day/night). The nutritional treatment started at early bolting stage (GS31) labelled 0 dat. Two modalities were applied, half of the plants were supplied with non-limiting nitrate (HN, 3.75 mM), the other half received limiting nitrate (LN, 0.375 mM). Plants were harvested at three different growth stages: 7 dat (GS32: bolting stage), 14 dat (GS53: flower buds raised above the youngest leaves) and 21 dat (first petals are visible). From four independent plant for each conditions, a mature leaf at 7 dat which became senescent at 21 dat was labelled and sampled at each corresponding dates (i.e. 7, 14 and 21 dat).

2.4.2. Sample preparation

Leaf samples were quenched in liquid nitrogen and ground to powder in a mortar. Powdered samples were separated into two fractions, one part was lyophilized for liquid/liquid extraction and metabolome profiling, the second part was used to extract total RNAs. Samples for metabolome analysis were extracted with the MeOH/H₂O/MTBE methods (Krueger *et al.*, 2014) adapted by Dechaumet *et al.* (submitted). Briefly, the extraction mixture consisted in MeOH/MTBE (1:3) with internal standards (leucine-5,5,5-d₃, L-tryptophan-2,3,3-d₃, 2,4,5,6,7-d₅-3-acetic acid and 1,14-tetradecanedioic-d₂₄ acid for untargeted profiling; adonitol and BABA for amino acid and carbohydrate targeted analysis). Extraction was performed by adding 1 ml of the extraction mixture (-15 °C) to 10 mg of lyophilised sample, then shaken for 1 h and followed by a sonication step (15 min at 4 °C). Phase separation was obtained by adding 650 μl of H₂O/MeOH (3:1) immediately vortexed for 1 min and followed by a 5 min centrifugation step at 12 000 g. The lower polar phase was collected and stored at -80 °C for targeted and untargeted profiling. A fraction of each biological sample was pooled together for Quality Controls (QCs) preparation.

2.4.3. Transcriptomic microarray

The custom chips BRSIK60K (3' eukaryotic gene expression type) from Affymetrix comprised 61 131 probe sets mostly from *B. napus* (80 %), *B. rapa* and *B. oleracea*. The entire procedures of microarray experiments, including the RNA purification, cDNA probe preparation, target hybridization, washing, staining, scanning, image analysis and initial data processing, were performed by Biogemma (France). Briefly, total RNAs extraction was performed using the SV96 Total RNA Isolation System (Promega) with a step of filtration on DNase column. Quality was assessed by measuring two indicators: (1)

ribosomal subunits RNA 28S/18S ratio by capillary electrophoresis and (2) the A260/A230 ratios by spectrophotometry. Extracted RNAs with 28S/18S near 2 and a A260/A230 near 1 were used for hybridization. Probes were made from total RNA with the 3' IVT Express Kit (Affymetrix #901229) and fragmented according to the chip specification (average of 100 nt). Each samples were hybridized for 16 h at 45 °C, washed and stained using "Hybridization, Wash, and Stain Kit" (Affymetrix #900720). Quality controls were used for amplification with Poly-A controls, hybridization with different quantities of control spikes (bioB, bioC, bioD and cre). Data obtained were normalized using the robust multichip average (RMA) method. Normalized transcriptomic data analysis was conducted as follow: Probes sequences were annotated against *B. napus* x Darmor genome and *A. thaliana* homologs using TAIR (Garcia-Hernandez *et al.*, 2002). The best hit based on E-value and query cover was chosen. Thus, in the following the microarray-selected genes are designated as homologues of *A. thaliana* (17 858 unique *A. thaliana* genes were mapped to at least one probe). Probes targeting the same *B. napus* gene were averaged and probes matching multiple *B. napus* genes were discarded leaving 12 884 probes. Normalized intensities were compared between each biological conditions and background noise and irrelevant probes were filtered out if the variation between biological conditions were lower than 10 % (CVs) leaving 3 455 probes which were used in this paper.

2.4.4. Untargeted metabolomic by HRMS

Metabolomic profiling of the polar fraction obtained with MeOH/H₂O/MTBE extraction was performed on an LC-HRMS setup according to Dechaumet *et al.* (submitted). Briefly, the chromatographic separation was performed on an Ultimate 3 000 Dionex High Performance Liquid Chromatography (HPLC, Thermo Fisher) mounted with a reverse phase Hypersil Gold C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.9 µm particle size, Thermo Fisher Scientific) maintained at 35 °C. Mobile phases consisted in water (A) and acetonitrile (B), both with 0.1 % acetic acid. A linear gradient was performed at 0.4 ml.min⁻¹ and started with 5 % of B for 2.40 min, then increased to 25 % at 4.50 min, 70 % at 11 min, 100 % at 14 min and 5 % at 19 min and holding until 25 min. The LC system was coupled to an Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer (Q Exactive™, Thermo Fisher Scientific) with an Heated Electrospray Ionization source (HESI). The spectrometric parameters were set as follows: spray voltages: -3.0 kV and 3.0 kV in negative and positive mode respectively, sheath and auxiliary nitrogen flow-rates: 55 and 10 a.u (arbitrary units) respectively, capillary temperature: 350 °C, heater temperature: 300 °C. A polarity switching ion mode with a mass range of m/z 65-975 was used at a mass resolving power

of 70 000 Full Width Half Maximum (FWHM). Each day, external mass calibration was done with a Pierce™ LTQ Velos ESI Positive for the positive ionization mode and Pierce™ Negative for the negative ionization mode (Thermo Fisher Scientific). Prior to analyses, 10 µl of the polar phase extracts were dried at 25 °C under a gentle nitrogen flow and dissolved in 1 000 µl ACN:H₂O (1:1, v/v). Then 5 µl were injected in the LC-HRMS system. The sample sequences were randomly arranged to ensure that no run order bias was present in the resulting data and Quality Controls (QCs) corresponding to a fraction of each biological sample was inserted every 5 samples. MSconverter tool was used to convert Xcalibur data files (*.raw) to open format (*.mzXML). Data were then processed under R environment version 3.3.0 (R Development Core Team, 2008) using RStudio interface (RStudio Team, 2015) and the following packages: “IPO” (Libiseller *et al.*, 2015) for determining optimal features detection parameters, “XCMS” (Tautenhahn *et al.*, 2008) for feature detection and grouping, “Workflow4Metabolomic” (Giacomoni *et al.*, 2015) for intra and inter-batch normalization under Galaxy, “CAMERA” (Kuhl *et al.*, 2012) for automatic pre-annotation of features, “ggplot2” (Wickham, 2016) for data representation, “FactoMineR” (Lê *et al.*, 2008) for principal component analysis, “factoextra” (Kassambara *et al.*, 2016) for clustering, “ropls” (Thévenot *et al.*, 2015) for multivariate discriminant analysis and “mixomics” for CCA (Rohart *et al.*, 2017). Optimal feature detection parameters were calculated by “IPO” and refined manually to increase the PPC score from QC samples for positive and negative modes individually. As the results in positive and negative mode were similar, we used the same parameters for peak integration and grouping for both ionization modes (peak width: 2 to 90 s; ppm: 3; mzdif: 0.001; sn threshold: 10, prefilter: 3 scans at 300 000; profile step: 0.01; bw: 30 for the first grouping step and 5 for the second; mzwid: 0.003). The stable retention time window used was from 20 to 1040 sec, only the mass tags inside this range were used and those with more than 30 % of variation in QCs after normalization were discarded. Isotopes, adducts and ions without at least its first isotope, were removed leaving 1 172 metabolic features (623 in positive and 549 in negative modes). The exact mass of each feature was searched for in KEGG (Kanehisa and Goto, 2000) and AraCyc (Rhee *et al.*, 2006) compound databases with a threshold of 3 ppm. Annotations were manually curated to keep only probable compounds in *B. napus*, and kept only if there were (1) unique annotation and (2) unique exact mass in the whole dataset.

2.4.5. Carbohydrate targeted profiling by GC-FID

Non-structural carbohydrates and organic acids were analysed by GC-FID as described by Adams *et al.* (1999) and refined by Lukan *et al.* (2009) with some modifications. Briefly, 50 μl of the polar extracts were evaporated with a Speed-Vac concentrator at 30 °C and resuspended in 50 μl of pyridine with methoxyamine (20 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). After 90 min at 30 °C, 50 μl of MSTFA (N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide) were added and incubated at 37 °C for 30 min. After 4 h at room temperature, 1 μl was injected into a Trace 2000 GC-FID (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, CA, USA) fit out with an AS2000 autosampler (Thermo-Fisher Scientific), a split/splitless injector (split mode set to 1:25) at 230 °C, a J&W DB5 30 m \times 0.32 mm \times 0.25 mm column and a flame ionization detector at 250 °C. The temperature gradient was as follows: 5 min at 70 °C, 5 °C min^{-1} up to 220 °C, 2 °C min^{-1} up to 260 °C, 20 °C min^{-1} to 300 °C and finally 5 min at 300 °C.

2.4.6. Amino acid targeted profiling by LC-UV

Amino acids (AAs) were analysed by UPLC-DAD with Waters kit (Waters Corporation, Milford, MA, USA), according to the method described by Cohen and Michaud, (1993), adapted by Bouchereau *et al.* (1999) and refined by Renault *et al.* (2010) and Albert *et al.* (2012). Briefly, 5 μl of the polar extracts were evaporated with a Speed-Vac concentrator at 30 °C and resuspended in MilliQ water. Then 5 μl were mixed with 35 μl of AccQ•Tag borate buffer and 10 μl of AccQ•Tag reagent solution. The reaction was done at 55 °C during 10 min and transferred in UPLC vials for analysis. Then 1 μl was injected onto an Acquity™ UPLC BEH C18 1.7 μm 2.1 \times 100 mm column (Waters) heated to 55 °C at 0.7 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Amino acids were detected at 260 nm using a photodiode array detector. The content of individual amino acids was expressed in $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry weight with reference to the BABA internal standard and to the external calibration curves of amino acids.

Supplementary table III-I: Functional enrichment (from Pantherdb) of genes involved in genotypic differences between Oase and Aviso under high (HN) and low (LN) nitrogen supplies. Only the transporter classes are shown.

| Cat | Genotype | Nitrogen | Type | Class | Gene |
|-------------|----------|----------|------|--|-----------|
| Transporter | Aviso | HN | up | transporter(PC00227) | AT2G04040 |
| Transporter | Aviso | HN | up | carbohydrate transporter(PC00067) | AT1G75220 |
| Transporter | Aviso | HN | up | transporter(PC00227) | AT5G46050 |
| Transporter | Aviso | HN | up | transporter(PC00227) | AT2G25810 |
| Transporter | Aviso | HN | up | transmembrane receptor/adaptor protein(PC00226);transporter(PC00227) | AT2G30080 |
| Transporter | Aviso | HN | up | amino acid transporter(PC00046) | AT2G28900 |
| Transporter | Aviso | HN | up | ATP-binding cassette (ABC) transporter(PC00003) | AT3G55130 |
| Transporter | Aviso | HN | up | amino acid transporter(PC00046) | AT1G58030 |
| Transporter | Aviso | HN | up | ATP-binding cassette (ABC) transporter(PC00003) | AT5G06530 |
| Transporter | Aviso | HN | up | ATP-binding cassette (ABC) transporter(PC00003) | AT2G26910 |
| Transporter | Aviso | HN | up | amino acid transporter(PC00046);calmodulin(PC00061);mitochondrial carrier protein(PC00158);transfer/carrier protein(PC00219) | AT3G20240 |
| Transporter | Aviso | HN | up | transporter(PC00227) | AT2G04050 |
| Transporter | Aviso | HN | up | amino acid transporter(PC00046) | AT5G40780 |
| Transporter | Aviso | HN | up | cation transporter(PC00068) | AT5G64280 |
| Transporter | Aviso | HN | up | RNA binding protein(PC00031);serine/threonine protein kinase receptor(PC00205);transporter(PC00227) | AT1G31920 |
| Transporter | Aviso | HN | up | transporter(PC00227) | AT1G69870 |
| Transporter | Aviso | HN | up | ATP synthase(PC00002);hydrolase(PC00121) | AT3G01390 |
| Transporter | Aviso | HN | up | transporter(PC00227) | AT4G21570 |
| Transporter | Oase | HN | up | amino acid transporter(PC00046) | AT5G40670 |
| Transporter | Oase | HN | up | transporter(PC00227) | AT2G25810 |
| Transporter | Oase | HN | up | amino acid transporter(PC00046) | AT2G39130 |
| Transporter | Oase | HN | up | transporter(PC00227) | AT5G65380 |
| Transporter | Oase | HN | up | transporter(PC00227) | AT1G12930 |
| Transporter | Oase | HN | up | transmembrane receptor/adaptor protein(PC00226);transporter(PC00227) | AT2G30080 |
| Transporter | Oase | HN | up | amino acid transporter(PC00046) | AT2G28900 |
| Transporter | Oase | HN | up | transporter(PC00227) | AT3G08040 |
| Transporter | Oase | HN | up | cation transporter(PC00068);hydrolase(PC00121);ion channel(PC00133) | AT2G24520 |
| Transporter | Oase | HN | up | transporter(PC00227) | AT2G36830 |
| Transporter | Oase | HN | up | amino acid transporter(PC00046) | AT1G24400 |
| Transporter | Oase | HN | up | cation transporter(PC00068) | AT4G00370 |
| Transporter | Oase | HN | up | ATP-binding cassette (ABC) transporter(PC00003) | AT5G06530 |
| Transporter | Oase | HN | up | ATP-binding cassette (ABC) transporter(PC00003) | AT2G26910 |
| Transporter | Oase | HN | up | carbohydrate transporter(PC00067) | AT3G18830 |
| Transporter | Oase | HN | up | amino acid transporter(PC00046) | AT2G39890 |
| Transporter | Oase | HN | up | transporter(PC00227) | AT1G12110 |
| Transporter | Oase | HN | up | transmembrane receptor/adaptor protein(PC00226);transporter(PC00227) | AT3G12750 |
| Transporter | Oase | HN | up | amino acid transporter(PC00046);calmodulin(PC00061);mitochondrial carrier protein(PC00158);transfer/carrier protein(PC00219) | AT4G32400 |
| Transporter | Oase | HN | up | transporter(PC00227) | AT1G47530 |
| Transporter | Oase | HN | up | carbohydrate transporter(PC00067) | AT1G11260 |
| Transporter | Oase | HN | up | transporter(PC00227) | AT1G68570 |
| Transporter | Oase | HN | up | cation transporter(PC00068);hydrolase(PC00121);ion channel(PC00133) | AT4G00900 |
| Transporter | Oase | HN | up | transporter(PC00227) | AT1G71870 |
| Transporter | Oase | HN | up | carbohydrate transporter(PC00067) | AT4G02050 |
| Transporter | Oase | HN | up | RNA binding protein(PC00031);serine/threonine protein kinase receptor(PC00205);transporter(PC00227) | AT3G28640 |
| Transporter | Oase | HN | up | transporter(PC00227) | AT4G23010 |
| Transporter | Oase | HN | up | cation transporter(PC00068);hydrolase(PC00121);ion channel(PC00133) | AT2G41560 |
| Transporter | Oase | HN | up | ATP-binding cassette (ABC) transporter(PC00003);hydrolase(PC00121);translation elongation factor(PC00222) | AT5G64840 |
| Transporter | Oase | HN | up | transporter(PC00227) | AT2G21340 |
| Transporter | Aviso | LN | up | carbohydrate transporter(PC00067) | AT1G75220 |
| Transporter | Aviso | LN | up | amino acid transporter(PC00046) | AT2G39130 |
| Transporter | Aviso | LN | up | amino acid transporter(PC00046) | AT2G28900 |
| Transporter | Aviso | LN | up | ATP-binding cassette (ABC) transporter(PC00003) | AT3G55130 |
| Transporter | Aviso | LN | up | amino acid transporter(PC00046) | AT1G24400 |
| Transporter | Aviso | LN | up | transporter(PC00227) | AT1G61890 |
| Transporter | Aviso | LN | up | ATP-binding cassette (ABC) transporter(PC00003) | AT2G26910 |
| Transporter | Aviso | LN | up | amino acid transporter(PC00046) | AT1G25530 |
| Transporter | Aviso | LN | up | carbohydrate transporter(PC00067) | AT3G18830 |
| Transporter | Aviso | LN | up | transporter(PC00227) | AT2G04050 |
| Transporter | Aviso | LN | up | cation transporter(PC00068) | AT5G64280 |
| Transporter | Aviso | LN | up | RNA binding protein(PC00031);serine/threonine protein kinase receptor(PC00205);transporter(PC00227) | AT1G31920 |
| Transporter | Aviso | LN | up | carbohydrate transporter(PC00067) | AT1G19450 |
| Transporter | Aviso | LN | up | amino acid transporter(PC00046) | AT1G77380 |
| Transporter | Aviso | LN | up | carbohydrate transporter(PC00067) | AT4G02050 |
| Transporter | Aviso | LN | up | cation transporter(PC00068);hydrolase(PC00121) | AT3G25610 |
| Transporter | Aviso | LN | up | ATP synthase(PC00002);hydrolase(PC00121) | AT3G01390 |
| Transporter | Aviso | LN | up | transporter(PC00227) | AT5G17700 |
| Transporter | Aviso | LN | up | transporter(PC00227) | AT1G11670 |
| Transporter | Oase | LN | up | amino acid transporter(PC00046) | AT5G40670 |
| Transporter | Oase | LN | up | transporter(PC00227) | AT5G46050 |
| Transporter | Oase | LN | up | cation transporter(PC00068);hydrolase(PC00121);ion channel(PC00133) | AT2G24520 |
| Transporter | Oase | LN | up | transporter(PC00227) | AT2G36830 |
| Transporter | Oase | LN | up | cation transporter(PC00068) | AT4G00370 |
| Transporter | Oase | LN | up | amino acid transporter(PC00046);calmodulin(PC00061);mitochondrial carrier protein(PC00158);transfer/carrier protein(PC00219) | AT4G32400 |
| Transporter | Oase | LN | up | transporter(PC00227) | AT1G47530 |
| Transporter | Oase | LN | up | carbohydrate transporter(PC00067) | AT1G11260 |
| Transporter | Oase | LN | up | transporter(PC00227) | AT1G68570 |
| Transporter | Oase | LN | up | cation transporter(PC00068);hydrolase(PC00121);ion channel(PC00133) | AT4G00900 |
| Transporter | Oase | LN | up | transporter(PC00227) | AT2G02040 |
| Transporter | Oase | LN | up | cation transporter(PC00068);hydrolase(PC00121);ion channel(PC00133) | AT2G19110 |
| Transporter | Oase | LN | up | carbohydrate transporter(PC00067) | AT4G02050 |
| Transporter | Oase | LN | up | transporter(PC00227) | AT2G21340 |

Supplementary table III-II: Functional enrichment (from Pantherdb) of genes involved in genotypic differences between Oase and Aviso under high (HN) and low (LN) nitrogen supplies. Only the proteases classes are shown.

| Cat | Genotype | Nitrogen | Type | Class | Gene |
|-----------|----------|----------|------|---|-----------|
| Proteases | Aviso | HN | up | chromatin/chromatin-binding protein(PC00077);metalloprotease(PC00153);transcription cofactor(PC00217) | AT1G01060 |
| Proteases | Aviso | HN | up | serine protease(PC00203) | AT1G18600 |
| Proteases | Aviso | HN | up | G-protein modulator(PC00022);cysteine protease(PC00081) | AT1G04830 |
| Proteases | Aviso | HN | up | serine protease(PC00203) | AT3G51000 |
| Proteases | Aviso | HN | up | serine protease(PC00203) | AT5G58310 |
| Proteases | Aviso | HN | up | serine protease(PC00203) | AT4G16690 |
| Proteases | Aviso | HN | up | cysteine protease(PC00081);protease inhibitor(PC00191) | AT5G43060 |
| Proteases | Aviso | HN | up | protease inhibitor(PC00191);serine protease(PC00203) | AT1G04110 |
| Proteases | Aviso | HN | up | serine protease(PC00203) | AT5G21950 |
| Proteases | Aviso | HN | up | cysteine protease(PC00081) | AT5G10790 |
| Proteases | Aviso | HN | up | chromatin/chromatin-binding protein(PC00077);metalloprotease(PC00153);transcription cofactor(PC00217) | AT5G02840 |
| Proteases | Aviso | HN | up | serine protease(PC00203) | AT1G15000 |
| Proteases | Aviso | HN | up | aspartic protease(PC00053) | AT4G33490 |
| Proteases | Aviso | HN | up | cysteine protease(PC00081) | AT3G07090 |
| Proteases | Aviso | HN | up | protease(PC00190) | AT4G29210 |
| Proteases | Aviso | HN | up | aspartic protease(PC00053) | AT5G10770 |
| Proteases | Aviso | HN | up | cysteine protease(PC00081);ligase(PC00142) | AT1G30820 |
| Proteases | Aviso | HN | up | serine protease(PC00203) | AT2G33530 |
| Proteases | Aviso | HN | up | protease inhibitor(PC00191);serine protease(PC00203) | AT5G67360 |
| Proteases | Oase | HN | up | protease inhibitor(PC00191);serine protease(PC00203) | AT2G04160 |
| Proteases | Oase | HN | up | protease inhibitor(PC00191);serine protease(PC00203) | AT5G67360 |
| Proteases | Oase | HN | up | phospholipase(PC00186);serine protease(PC00203) | AT3G62860 |
| Proteases | Oase | HN | up | cysteine protease(PC00081) | AT1G78670 |
| Proteases | Oase | HN | up | cysteine protease(PC00081) | AT5G64240 |
| Proteases | Oase | HN | up | cysteine protease(PC00081);protease inhibitor(PC00191) | AT1G02305 |
| Proteases | Oase | HN | up | cysteine protease(PC00081);protease inhibitor(PC00191) | AT1G20850 |
| Proteases | Oase | HN | up | cysteine protease(PC00081);dehydrogenase(PC00092);reductase(PC00198) | AT5G53460 |
| Proteases | Oase | HN | up | metalloprotease(PC00153) | AT5G19740 |
| Proteases | Oase | HN | up | metalloprotease(PC00153) | AT1G10050 |
| Proteases | Oase | HN | up | serine protease(PC00203) | AT4G16690 |
| Proteases | Oase | HN | up | serine protease(PC00203) | AT2G23000 |
| Proteases | Oase | HN | up | serine protease(PC00203) | AT4G33180 |
| Proteases | Oase | HN | up | serine protease(PC00203) | AT3G57680 |
| Proteases | Oase | HN | up | serine protease(PC00203) | AT4G37470 |
| Proteases | Oase | HN | up | serine protease(PC00203) | AT4G24160 |
| Proteases | Oase | HN | up | serine protease(PC00203) | AT1G78210 |
| Proteases | Oase | HN | up | serine protease(PC00203) | AT2G22980 |
| Proteases | Oase | HN | up | chromatin/chromatin-binding protein(PC00077);metalloprotease(PC00153);transcription cofactor(PC00217) | AT5G17300 |
| Proteases | Oase | HN | up | chromatin/chromatin-binding protein(PC00077);metalloprotease(PC00153);transcription cofactor(PC00217) | AT1G01060 |
| Proteases | Oase | HN | up | chromatin/chromatin-binding protein(PC00077);metalloprotease(PC00153);transcription cofactor(PC00217) | AT5G02840 |
| Proteases | Oase | HN | up | chromatin/chromatin-binding protein(PC00077);metalloprotease(PC00153);transcription cofactor(PC00217) | AT4G01280 |
| Proteases | Oase | HN | up | chromatin/chromatin-binding protein(PC00077);metalloprotease(PC00153);transcription cofactor(PC00217) | AT3G09600 |
| Proteases | Oase | HN | up | RNA binding protein(PC00031);cysteine protease(PC00081);transcription factor(PC00218) | AT3G14990 |
| Proteases | Aviso | LN | up | chromatin/chromatin-binding protein(PC00077);metalloprotease(PC00153);transcription cofactor(PC00217) | AT5G37260 |
| Proteases | Aviso | LN | up | chromatin/chromatin-binding protein(PC00077);metalloprotease(PC00153);transcription cofactor(PC00217) | AT1G01060 |
| Proteases | Aviso | LN | up | serine protease(PC00203) | AT1G18600 |
| Proteases | Aviso | LN | up | serine protease(PC00203) | AT3G47590 |
| Proteases | Aviso | LN | up | G-protein modulator(PC00022);cysteine protease(PC00081) | AT1G04830 |
| Proteases | Aviso | LN | up | cysteine protease(PC00081);serine protease(PC00203) | AT1G02520 |
| Proteases | Aviso | LN | up | aspartic protease(PC00053) | AT1G01300 |
| Proteases | Aviso | LN | up | chromatin/chromatin-binding protein(PC00077);metalloprotease(PC00153);transcription cofactor(PC00217) | AT5G17300 |
| Proteases | Aviso | LN | up | cysteine protease(PC00081) | AT2G36430 |
| Proteases | Aviso | LN | up | cysteine protease(PC00081) | AT1G78670 |
| Proteases | Aviso | LN | up | serine protease(PC00203) | AT4G16690 |
| Proteases | Aviso | LN | up | phospholipase(PC00186);serine protease(PC00203) | AT5G19290 |
| Proteases | Aviso | LN | up | lipase(PC00143);serine protease(PC00203) | AT1G49660 |
| Proteases | Aviso | LN | up | chromatin/chromatin-binding protein(PC00077);metalloprotease(PC00153);transcription cofactor(PC00217) | AT4G01280 |
| Proteases | Aviso | LN | up | cysteine protease(PC00081) | AT3G16850 |
| Proteases | Aviso | LN | up | cysteine protease(PC00081);serine protease(PC00203) | AT2G36910 |
| Proteases | Aviso | LN | up | serine protease(PC00203) | AT5G21950 |
| Proteases | Aviso | LN | up | chromatin/chromatin-binding protein(PC00077);metalloprotease(PC00153);transcription cofactor(PC00217) | AT5G02840 |
| Proteases | Aviso | LN | up | serine protease(PC00203) | AT1G15000 |
| Proteases | Aviso | LN | up | cysteine protease(PC00081);dehydrogenase(PC00092);reductase(PC00198) | AT5G04140 |
| Proteases | Aviso | LN | up | aspartic protease(PC00053) | AT5G10770 |
| Proteases | Aviso | LN | up | cysteine protease(PC00081);serine protease(PC00203) | AT1G32190 |
| Proteases | Aviso | LN | up | cysteine protease(PC00081);ligase(PC00142) | AT1G30820 |
| Proteases | Aviso | LN | up | serine protease(PC00203) | AT2G33530 |
| Proteases | Oase | LN | up | aspartic protease(PC00053) | AT2G39710 |
| Proteases | Oase | LN | up | cysteine protease(PC00081) | AT5G64240 |
| Proteases | Oase | LN | up | chromatin/chromatin-binding protein(PC00077);metalloprotease(PC00153);transcription cofactor(PC00217) | AT1G01060 |
| Proteases | Oase | LN | up | phospholipase(PC00186);serine protease(PC00203) | AT5G11650 |
| Proteases | Oase | LN | up | cysteine protease(PC00081);protease inhibitor(PC00191) | AT1G02305 |
| Proteases | Oase | LN | up | phospholipase(PC00186);serine protease(PC00203) | AT3G62860 |
| Proteases | Oase | LN | up | protease inhibitor(PC00191);serine protease(PC00203) | AT2G04160 |
| Proteases | Oase | LN | up | cysteine protease(PC00081);protease inhibitor(PC00191) | AT4G16190 |
| Proteases | Oase | LN | up | cysteine protease(PC00081) | AT1G23440 |
| Proteases | Oase | LN | up | chromatin/chromatin-binding protein(PC00077);metalloprotease(PC00153);transcription cofactor(PC00217) | AT3G09600 |
| Proteases | Oase | LN | up | chromatin/chromatin-binding protein(PC00077);metalloprotease(PC00153);transcription cofactor(PC00217) | AT4G01280 |
| Proteases | Oase | LN | up | G-protein modulator(PC00022);cysteine protease(PC00081) | AT2G20440 |
| Proteases | Oase | LN | up | cysteine protease(PC00081);protease inhibitor(PC00191) | AT5G43060 |
| Proteases | Oase | LN | up | chromatin/chromatin-binding protein(PC00077);metalloprotease(PC00153);transcription cofactor(PC00217) | AT5G02840 |
| Proteases | Oase | LN | up | metalloprotease(PC00153) | AT1G10050 |
| Proteases | Oase | LN | up | serine protease(PC00203) | AT3G57680 |
| Proteases | Oase | LN | up | cysteine protease(PC00081);protease inhibitor(PC00191) | AT1G20850 |
| Proteases | Oase | LN | up | RNA binding protein(PC00031);cysteine protease(PC00081);transcription factor(PC00218) | AT2G38860 |
| Proteases | Oase | LN | up | RNA binding protein(PC00031);cysteine protease(PC00081);transcription factor(PC00218) | AT3G14990 |
| Proteases | Oase | LN | up | aspartic protease(PC00053) | AT3G18490 |
| Proteases | Oase | LN | up | serine protease(PC00203) | AT4G33180 |
| Proteases | Oase | LN | up | metalloprotease(PC00153) | AT5G19740 |
| Proteases | Oase | LN | up | protease inhibitor(PC00191);serine protease(PC00203) | AT5G67360 |

**CONCLUSION GENERALE ET
PERSPECTIVES**

CONCLUSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES

En tant que deuxième production oléagineuse dans le monde après le soja, le colza présente un intérêt agronomique et stratégique majeur grâce à des usages agro-alimentaires et industriels diversifiés. Comme pour la plupart des grandes cultures, le rendement grainier optimisé est dépendant de l'apport de fertilisants et plus particulièrement d'azote. Cet intrant représente le principal poste de dépense dans un système de production de colza d'hiver et dès lors que l'apport dépasse les capacités d'utilisation, il représente une menace pour l'environnement. Dans le contexte socio-économique et environnemental actuel, la diminution des apports azotés est devenue une nécessité afin d'améliorer la compétitivité du colza. De ce fait, l'un des principaux objectifs de sélection du colza aujourd'hui est d'améliorer son efficacité d'utilisation des nutriments et de l'azote (EUA) en particulier.

Pendant sa phase végétative de croissance, l'EUA du colza est majoritairement conditionnée par ses propriétés d'absorption et d'assimilation du nitrate et par ses capacités de remobilisation de l'azote organique (ERA) à partir des feuilles vieillissantes vers les feuilles en croissance (Avice and Etienne 2014). En effet, il a été montré que les principales caractéristiques des géotypes à NUE élevée sont liées à de bonnes performances de l'ERA foliaire (Girondé et al., 2015). Au stade reproducteur, les processus d'absorption (EAbA) mais surtout de remobilisation de l'azote à partir des tiges et des péricarpes seraient les principaux facteurs de variation de l' EUA entre les géotypes (Balint and Rengel 2008 ; Girondé et al., 2015).

Les capacités de remobilisation foliaire des nutriments sont étroitement liées à la mise en place et à la régulation contrôlée des processus de vieillissement cellulaire et d'autophagie qui interviennent pendant la sénescence foliaire. Ils se caractérisent notamment par la mise en place des mécanismes de démantèlement des organites et des macromolécules et notamment des chloroplastes, l'activation de voies de recyclage métabolique des produits de dégradation et de systèmes de transports actifs des ressources nutritives ainsi que des processus de production d'énergie. Une régulation optimale de l'ensemble de ces fonctions s'avère donc nécessaire pour assurer une ERA élevée. Les informations acquises au cours de ce travail de thèse ont ainsi contribué à alimenter notre connaissance des déterminants métaboliques qui concourent à la mise en oeuvre des

successions opérationnelles conférant aux tissus foliaires en développement leurs propriétés trophiques de puits puis de sources aussi bien pendant la phase végétative de croissance que pendant celle reproductrice d'élaboration du rendement en grains. Les éléments de conclusion de notre travail peuvent ainsi être déclinés selon trois faits marquants :

Une réorganisation spatiale et temporelle très marquée des métabolismes primaire et secondaire au cours du développement foliaire

L'évolution développementale du métabolisme, décrite à partir de l'analyse ciblée ou non de la fraction polaire des extraits de feuilles, a été définie selon plusieurs dimensions : l'organisation phyllotaxique de la plante, l'âge du rang foliaire, l'organisation longitudinale du limbe foliaire et enfin selon le continuum fonctionnel mésophylle, nervure centrale et sève phloémienne.

L'étude a permis de mettre en évidence que l'évolution de la signature métabolique des tissus foliaires était avant tout conditionnée aux états de transition physiologique associée aux différentes phases de développement mais aussi à la position de la feuille sur l'axe de la plante déterminée par la phyllochronie. Chaque étage foliaire est défini par une empreinte métabolique qui lui est propre et dont l'évolution dépend de sa position sur l'axe de la plante, générant un micro-environnement lumineux et thermique spécifique, et des relations d'interactions trophiques établies avec les organes inférieurs et supérieurs. Nous avons pu ainsi démontrer que malgré un cheminement métabolique comparable entre les feuilles, leur situation dans le couvert leur confère des particularités développementales qui impriment un profil métabolique remarquable. A la question, sans réponse évidente, qui consiste à savoir si c'est le métabolisme qui pilote le développement ou bien à l'inverse si le développement contribue à régler le métabolisme, les informations recueillies ont tendance à orienter vers la deuxième solution. Sur la base des profils métabolomiques obtenus, un âge métabolique et fonctionnel a pu être attribué aux tissus foliaires. Cette approche a permis de définir des signatures liées à six stades clés du développement de la feuille depuis la phase d'émergence et d'expansion jusqu'au stade de sénescence avancée. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence des processus déterminants liés à la transition puits-source des tissus. Ces transitions sont en lien étroit avec les variations qualitatives et quantitatives de composés régulateurs, notamment le SA, le JA, l'ABA et l'IAA. En effet, ces hormones bien connues pour être impliquées dans la régulation des processus développementaux ont, pour la première fois, pu être décrites pour leurs actions séquentielles au cours du développement foliaire du colza. Nous avons

ainsi montré l'intervention de l'IAA dans le développement des tissus en croissance, celle de l'ABA et du SA dans les tissus en sénescence et celle du JA lors de la phase de transition source-puits. Néanmoins le profilage réalisé est loin d'être exhaustif et l'implication de leurs formes conjuguées ainsi que celle de l'éthylène, des brassinostéroïdes et des cytokinines doit être recherché. Pour chaque transition physiologique, nous avons pu observer des spécificités métaboliques. Par exemple les très jeunes feuilles en croissance sont caractérisées par la présence importante d'acides organiques, de glucosinolates et de coumarines et l'accumulation progressive d'hexoses (étroitement liée à l'accumulation de JA dans ce contexte). Des expériences complémentaires sont nécessaires pour attribuer ces dynamiques métaboliques à des processus fonctionnels, mais il apparaît que les organes puits s'appuient avant tout sur la consommation de ressources énergétiques et la mise en place d'éléments de structure. Les Brassicacées sont réputées pour leur capacité à produire des glucosinolates, composés soufrés avec des fonctions avérées dans les réactions de défense qui pourraient donc s'exprimer ici dans les tissus les plus jeunes et les tissus matures. Leur disparition pendant le vieillissement des tissus pourrait leur conférer un rôle dans le stockage transitoire et la ré-utilisation du soufre en particulier ; ils pourraient *via* leur transit phloémien contribuer eux-mêmes au transfert de nutriments à longue distance. Là encore, il s'agit d'un point à approfondir dans un contexte où l'analyse et l'amélioration de l'efficacité d'utilisation du soufre par le colza est à l'ordre du jour. Le métabolisme des acides aminés, est par nature, fortement associé à l'ERA et une accumulation observée pendant la sénescence pourrait s'avérer préjudiciable. C'est notamment le cas des acides aminés ramifiés (Leu, Val, Ile) ainsi que de la Met, du Trp et de la Phe, dont les surconcentrations ont déjà été observées au cours de la sénescence foliaire. Il est proposé que leur accumulation pourrait être associée à des voies de dégradation plus coûteuses énergétiquement et qui ne seraient pas privilégiées pendant la sénescence contrairement à celles d'autres substrats. Il peut également s'agir de déficiences liées à leur translocation et à leur chargement dans le phloème. En contrepartie, l'accumulation d'acides aminés aromatiques fournit des précurseurs à la biosynthèse d'agents anti-oxydants qui pourraient s'avérer bénéfiques dans les tissus vieillissants. Dans le cadre de l'optimisation de la NRE foliaire, déterminer les causes et les conséquences de leur accumulation permettrait de fournir de nouvelles pistes.

Si le profil métabolique des feuilles évolue singulièrement au cours de leur développement et fonction de leur micro-environnement, il est également montré au cours de ce travail qu'à l'échelle du limbe, le développement et la croissance des tissus n'est absolument pas homogène. La définition très claire des phénotypes métaboliques précisés à l'échelle de la

plante (ceux que nous avons définis au niveau des axes horizontaux et verticaux) eu égard le stade de développement de la feuille nous a permis, par analogie métabolique, de confirmer que la sénescence foliaire évolue de manière longitudinale et basipète. Il est également probable que le vieillissement progresse selon l'axe transversal depuis les bordures du limbe vers la nervure centrale. Les opérations de recyclage des nutriments sont donc privilégiées dans un premier temps dans les parties périphériques du limbe, privilégiant le fonctionnement des nervures de rangs 4 ou 5. La capacité à étendre le processus de sénescence à l'ensemble du limbe pourrait également être un critère d'efficacité de la remobilisation. S'agissant du fonctionnement des vaisseaux conducteurs, une hypothèse qui n'a pas été testée ici, et qui repose sur l'observation fréquente d'une accumulation de Gln et d'autres acides aminés généralement exportés, aux stades les plus avancées de la sénescence, consisterait à vérifier que passé un certain stade, les conduits phloémiens pourraient être obturés avant la chute des feuilles.

Un autre niveau d'hétérogénéité métabolique est décrit au niveau du limbe foliaire ; il repose sur la mise en évidence de signatures métaboliques différenciées entre les tissus du mésophylle, ceux de la nervure centrale et la composition des exsudats phloémiens de la même feuille. Les tissus de la nervure centrale, comme cela avait déjà été observé par d'autres auteurs, contribuent à remanier le métabolisme à partir de substrats probablement originaires des tissus du mésophylle. L'efficacité de remobilisation des nutriments est également très probablement à rechercher dans l'orientation et la dynamique des flux opérés au niveau de la nervure centrale avant l'exportation à longue distance des nutriments. Des analyses transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques plus poussées mériteraient d'y être réalisées, à différents stades de développement des tissus et en relation avec la force d'appel des puits. La surconcentration de glucose dans ces tissus de la nervure centrale reste très énigmatique quand il est généralement convenu, d'après la littérature, que le transport des sucres/photosynthétats s'effectue principalement sous la forme de saccharose (ou de polyols et d'oligosaccharides de la famille du raffinose dans certaines situations spécifiques). Nous avons très régulièrement observé la représentation très élevée du glucose et du fructose dans les tissus foliaires de colza au regard de celle souvent plus modeste du saccharose. S'agissant de la composition de la sève phloémienne du colza, l'azote apparaît véhiculé sous les formes conventionnelles de Gln, d'Asp, d'Ala et d'Asn. Plus surprenant, des quantités importantes de GABA et de Pro (dans les tissus jeunes) sont aussi retrouvées et pourraient contribuer significativement, chez le colza, à des échanges trophiques, énergétiques ou signalétiques qu'il conviendrait d'étudier plus

avant. La représentation importante de SMCSO dans le phloème est également un fait essentiel à étayer, s'agissant notamment des problématiques de ré-allocation du soufre. Comme évoqué ci-dessus la contribution de ces agents métaboliques mobiles à des fonctions de signalisation et de régulation à distance mériterait d'être étudiée.

Une contribution du métabolisme/catabolisme de la proline à l'alimentation des processus de recyclage des nutriments au cours de la sénescence

Le métabolisme de la proline retient surtout l'attention dans le cadre des ajustements métaboliques opérés par les plantes en situation de contraintes hydrique et osmotique, en particulier. C'est particulièrement vrai chez le colza qui exprime un potentiel remarquable d'accumulation de cet acide aminé (notamment dans les tissus jeunes et reproducteurs) en conditions de stress. La forte représentation de la proline dans les exsudats phloémiens de tissus foliaires jeunes et matures, observée lors de notre travail, indépendamment de toute contrainte hydrique, fait également penser qu'elle pourrait contribuer, au cours du développement, au transfert de nutriments (et éventuellement de pouvoir réducteur et osmotique). Les tissus vieillissants semblent perdre la capacité à accumuler la proline et nous avons pu démontrer, par infiltration de substrat marqué, qu'en phase de sénescence les propriétés de tissus foliaires à exporter la proline dans le phloème sont fortement limitées. Le laboratoire avait déjà montré que l'accumulation osmoinduite de proline était fortement pénalisée dans les tissus âgés. Il s'avérait donc cohérent de tester l'hypothèse d'une dégradation amplifiée de la proline au cours du vieillissement des tissus foliaires. Cette hypothèse a été confortée au cours de ce travail. Nous montrons clairement que des tissus sénescents disposent de capacités augmentées à dégrader la proline par voie oxydative. Le suivi des produits de ce catabolisme permet de révéler, sans ambiguïté, que la destination privilégiée de la proline conduit à la production de glutamate et de glutamine, mais aussi de GABA et d'intermédiaires du cycle de Krebs. Sur le plan fonctionnel, ce processus d'oxydation mitochondrial de la proline pourrait donc conduire à la production de composés facilement exportables dans la phloème et transporteurs d'azote, contribuerait au recyclage d'ammonium potentiellement abondant dans un contexte protéolytique et participerait au maintien du fonctionnement mitochondrial et à la production d'énergie à une période physiologique exigeante à ce niveau. En parfaite cohérence, démonstration est faite également que les gènes codant les Proline Déshydrogénases sont activées pendant la sénescence et notamment les *ProDH2*. Il avait précédemment été montré au laboratoire, que la surexpression des *ProDH2* au cours de la sénescence foliaire du colza était localisée

préférentiellement au niveau des tissus conducteurs. Les gènes codant certaines Glutamine Synthétases de type 1 sont également surexprimés à ce niveau. De telles observations vont dans le sens d'une coopération fonctionnelle de ces métabolismes à proximité de zones de ré-allocation de nutriments.

Un fait original rapporté par notre travail, concerne la photorégulation potentielle de ce processus de dégradation de la proline. Il est montré que l'engagement de proline marqué vers son catabolisme est bien plus prononcée dans des tissus foliaires sénescents à l'obscurité et, dans ce contexte, les gènes codants les deux familles de ProDH, ProDH1 et ProDH2 sont surexprimés. La dégradation nocturne de proline pose alors la question essentielle, non traitée, des capacités cataboliques des tissus foliaires la nuit et de leur potentiel à exporter ou à préparer des ressources exportables vers les tissus du phloème.

Une autre question importante à considérer, si l'hypothèse est formulée de la contribution essentielle de la proline et de son oxydation aux propriétés remobilisatrices des tissus sénescents, c'est son origine métabolique pour alimenter un tel processus. Il conviendrait d'apprécier ce que représente la proline d'origine protéolytique dans ce contexte.

De la variabilité génétique importante exprimée au niveau du métabolome et du transcriptome au cours de la sénescence foliaire et en réponse à la fertilisation azotée

La troisième et dernière partie des travaux de thèse expose des données dont le traitement devra être largement approfondi. Elles concernent l'analyse comparée d'informations transcriptomiques et métabolomiques visant à disséquer, chez deux génotypes décrits comme différenciés en matière d'usage de l'azote, les réseaux (géniques, métaboliques et de régulation) qui sous-tendent les processus de recyclage et de remobilisation de nutriments au cours de la sénescence foliaire. La période du cycle de développement de la plante, retenue pour une telle analyse, est celle qui correspond à la mise en place des composantes du rendement, en fin de montaison et pendant la floraison. Les processus de remobilisation trophique sont déterminants à ce stade même si les siliques et les graines ne constituent pas encore une force d'appel.

Alors que chez les deux génotypes, les tissus foliaires étudiés sont en phase de sénescence et de remobilisation, des divergences importantes sont montrées quant aux gènes et aux métabolites exprimés chez ces deux variétés. S'agissant des gènes, ceux qui codent des transporteurs de sucres, d'acides aminés et de protéases retiennent l'attention dans le cadre de la compréhension des processus impliqués et de la recherche de candidats

pertinents à l'amélioration des performances de remobilisation. Il conviendrait bien entendu d'étendre la prospection de la variabilité génétique exprimée à ce niveau. Nous avons tiré profit de la stimulation, avérée par d'autres études, de l'efficacité de remobilisation provoquée par la carence en azote dans les tissus foliaires du génotype. Aviso pour rechercher par des approches corrélatives et canoniques les réseaux de gènes intégrés à ceux des métabolites susceptibles d'expliquer ou, dans un premier temps de décrire, l'activation des processus de recyclage. L'analyse n'est pas aboutie, mais certains marqueurs géniques et métaboliques corrélés ont pu être mis en évidence. Les grands jeux de données à croiser, par des approches chimiométriques et statistiques sophistiquées, vont nécessiter d'y consacrer du temps qui ne pouvait malheureusement pas être pris dans le cadre de la thèse.

Cette analyse, encore en cours, soulève par ailleurs quelques questionnements quant aux perspectives des approches métabolomiques non ciblées. En effet, si elles sont particulièrement pertinentes pour repérer des marqueurs métaboliques associés à des processus biologiques spécifiques ou des conditions génétiques ou environnementales particulières, elles posent encore quelques problèmes majeurs non résolus. En premier lieu, la question du coût analytique et du temps de traitement des données restent prédominante quand il s'agit de manipuler un grand nombre d'échantillons, ce qu'imposent nécessairement les approches génétiques. Un deuxième obstacle est lié à la difficulté de répéter les approches analytiques, avec des informations qui sont fortement inféodées aux plateformes instrumentales utilisées. Un troisième point qui est celui qui nous pré-occupe majoritairement à cette période de traitement et d'analyse des informations acquises est la difficulté, même avec l'analyse de masses particulièrement précises et résolutive, à identifier les structures moléculaires concernées et donc à les intégrer dans des voies et des réseaux métaboliques afin de leur donner du sens biologique. Les méthodes évoluent et les bases de données s'enrichissent, mais s'agissant du colza ici, un effort considérable est encore à consentir pour préciser le catalogue phytochimique de cette espèce. Ajouté à cela les avancées à encourager en biologie des systèmes, qui visent à intégrer et simuler les interactions entre les différentes composantes d'un système biologique (génomique, transcriptome, métabolome, protéome, épigénomique) en réponse à des facteurs génétiques, biotiques et/ou abiotiques, les prochaines années s'annoncent passionnantes en termes de développements méthodologiques et d'avancées scientifiques qui pourront notamment être mis au service d'une meilleure compréhension du fonctionnement nutritionnelle de la plante de colza, notamment dans un environnement contraint et du développement de cibles valorisables en sélection ou en conduite de cultures à plus bas niveaux d'intrants.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdallah M., Dubousset L., Meuriot F., Etienne P., Avice J.-C., Ourry A. (2010)** Effect of mineral sulphur availability on nitrogen and sulphur uptake and remobilization during the vegetative growth of *Brassica napus L.* *Journal of experimental botany* **61**:2635–2646.
- Abrahám E., Rigó G., Székely G., Nagy R., Koncz C., Szabados L. (2003)** Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology* **51**:363–372.
- Adams M.A., Chen Z., Landman P., Colmer T.D. (1999)** Simultaneous determination by capillary gas chromatography of organic acids, sugars, and sugar alcohols in plant tissue extracts as their trimethylsilyl derivatives. *Analytical biochemistry* **266**:77–84.
- Adams E., Shin R. (2014)** Transport, signaling, and homeostasis of potassium and sodium in plants. *Journal of integrative plant biology* **56**:231–249.
- Afzal M., Alghamdi S.S., Habib Ur Rahman M., Ahmad A., Farooq T., Alam M., Khan I.A., Ullah H., Nasim W., Fahad S. (2018)** Current status and future possibilities of molecular genetics techniques in *Brassica napus*. *Biotechnology letters* **40**:479-492
- Albert B., Le Cahérec F., Niogret M.-F., Faes P., Avice J.-C., Leport L., Bouchereau A. (2012)** Nitrogen availability impacts oilseed rape (*Brassica napus L.*) plant water status and proline production efficiency under water-limited conditions. *Planta* **236**:659–676.
- Ali A., Gao X., Guo Y. (2018)** Initiation, progression, and genetic manipulation of leaf senescence. *Methods in molecular biology* **1744**:9–31.
- Allard P.-M., Genta-Jouve G., Wolfender J.-L. (2017)** Deep metabolome annotation in natural products research: towards a virtuous cycle in metabolite identification. *Current opinion in chemical biology* **36**:40–49.
- Allwood J.W., Goodacre R. (2010)** An introduction to liquid chromatography–mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochemical analysis: PCA* **21**:33–47.
- Almeida Trapp M., Trapp M.A., De Souza G.D., Rodrigues-Filho E., Boland W., Mithöfer A. (2014)** Validated method for phytohormone quantification in plants. *Frontiers in plant science* **5**:417
- Araújo W.L., Tohge T., Ishizaki K., Leaver C.J., Fernie A.R. (2011)** Protein degradation - an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trends in plant science* **16**:489–498.
- Arenas-Huertero F., Arroyo A., Zhou L., Sheen J., Leon P. (2000)** Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes & development* **14**:2085–2096.
- Atkinson B. (1977)** *Topics in enzyme and fermentation biotechnology* (W. Alan & H. Ellis, Eds.).

- 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.
- Awad H., Khamis M.M., El-Aneed A. (2015)** Mass spectrometry, review of the basics: ionization. *Applied Spectroscopy Reviews* **50**:158–175.
- Balazadeh S., Schildhauer J., Araújo W.L., Munné-Bosch S., Fernie A.R., Proost S., Humbeck K., Mueller-Roeber B. (2014)** Reversal of senescence by N resupply to N-starved *Arabidopsis thaliana*: transcriptomic and metabolomic consequences. *Journal of experimental botany* **65**:3975–3992.
- Balint T., Rengel Z. (2008)** Nitrogen efficiency of canola genotypes varies between vegetative stage and grain maturity. *Euphytica* **164**:421–432.
- Bariola P.A., MacIntosh G.C., Green P.J. (1999)** Regulation of S-like ribonuclease levels in *Arabidopsis*. Antisense inhibition of RNS1 or RNS2 elevates anthocyanin accumulation. *Plant physiology* **119**:331–342.
- Bar M., Ori N. (2014)** Leaf development and morphogenesis. *Development* **141**:4219–4230.
- Bartel J., Krumsiek J., Theis F.J. (2013)** Statistical methods for the analysis of high-throughput metabolomics data. *Computational and structural biotechnology journal* **4**:e201301009.
- Barupal D.K., Fan S., Fiehn O. (2018)** Integrating bioinformatics approaches for a comprehensive interpretation of metabolomics datasets. *Current opinion in biotechnology* **54**:1–9.
- Barupal D.K., Fiehn O. (2017)** Chemical Similarity Enrichment Analysis (ChemRICH) as alternative to biochemical pathway mapping for metabolomic datasets. *Scientific reports* **7**:14567.
- Bekaert M., Edger P.P., Hudson C.M., Pires J.C., Conant G.C. (2012)** Metabolic and evolutionary costs of herbivory defense: systems biology of glucosinolate synthesis. *The New phytologist* **196**:596–605.
- Berezkin V.G. (1989)** Biography of Mikhail Semenovich Tswett and translation of Tswett's preliminary communication on a new category of adsorption phenomena. *Chemical reviews* **89**:279–285.
- Biancucci M., Mattioli R., Moubayidin L., Sabatini S., Costantino P., Trovato M. (2015)** Proline affects the size of the root meristematic zone in *Arabidopsis*. *BMC plant biology* **15**:263.
- Bialeski R.L. (1968)** Levels of phosphate esters in *spirodela*. *Plant physiology* **43**:1297–1308.
- Bialeski R.L. (1969)** Phosphorus compounds in translocating phloem. *Plant physiology* **44**:497–502.

- Bilsborrow P.E., Evans E.J., Zhao F.J. (1993)** The influence of spring nitrogen on yield, yield components and glucosinolate content of autumn-sown oilseed rape (*Brassica napus*). *The Journal of agricultural science* **120**:219–224.
- Bishopp A., Mähönen A.P., Helariutta Y. (2006)** Signs of change: hormone receptors that regulate plant development. *Development* **133**:1857–1869.
- Biswal B. (1995)** Carotenoid catabolism during leaf senescence and its control by light. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **30**:3–13.
- Bligh E.G., Dyer W.J. (1959)** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* **37**:911–917.
- Bloch F., Hansen W.W., Packard M. (1946)** The nuclear induction experiment. *Physical Review* **70**:474–485.
- Bohner A., Kojima S., Hajirezaei M., Melzer M., von Wirén N. (2015)** Urea retranslocation from senescing *Arabidopsis* leaves is promoted by DUR3-mediated urea retrieval from leaf apoplast. *The Plant journal* **81**:377–387.
- Bouchereau A., Duhazé C., Martin-Tanguy J., Guégan J.-P., Larher F. (1999)** Improved analytical methods for determination of nitrogenous stress metabolites occurring in *Limonium* species. *Journal of chromatography A* **836**:209–221.
- Bouchereau A., Guénot P., Larher F. (2000)** Analysis of amines in plant materials. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications* **747**:49–67.
- Bouchet A.-S., Laperche A., Bissuel-Belaygue C., Snowdon R., Nesi N., Stahl A. (2016)** Nitrogen use efficiency in rapeseed. *Agronomy for Sustainable Development* **36**:38.
- Bouchet A.-S., Nesi N., Bissuel C., Bregeon M., Lariépe A., Navier H., Ribière N., Orsel M., Grezes-Besset B., Renard M., Laperche A. (2014)** Genetic control of yield and yield components in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) grown under nitrogen limitation. *Euphytica* **199**:183–205.
- Boughton B.A., Thinagaran D., Sarabia D., Bacic A., Roessner U. (2016)** Mass spectrometry imaging for plant biology: a review. *Phytochemistry reviews: proceedings of the Phytochemical Society of Europe* **15**:445–488.
- Bouma T.J., De Visser R., Van Leeuwen P.H., De Kock M.J., Lambers H. (1995)** The respiratory energy requirements involved in nocturnal carbohydrate export from starch-storing mature source leaves and their contribution to leaf dark respiration. *Journal of experimental botany* **46**:1185–1194.
- Bourgaud F., Hehn A., Larbat R., Doerper S., Gontier E., Kellner S., Matern U. (2006)** Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry reviews: proceedings of the Phytochemical Society of Europe* **5**:293–308.
- 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.

- 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.
- Bresson J., Bieker S., Riester L., Doll J., Zentgraf U. (2017)** A guideline for leaf senescence analyses: from quantification to physiological and molecular investigations. *Journal of experimental botany* **69**:769-786
- Brown P.D., Tokuhisa J.G., Reichelt M., Gershenzon J. (2003)** Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **62**:471–481.
- Brugiere N., Dubois F., Limami A.M., Lelandais M., Roux Y., Sangwan R.S., Hirel B. (1999)** Glutamine synthetase in the phloem plays a major role in controlling proline production. *The Plant cell* **11**:1995–2012.
- Buchanan-Wollaston V. (1997)** The molecular biology of leaf senescence. *Journal of experimental botany* **48**:181–199.
- 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*. *The Plant journal* **42**:567–585.
- Byrne D.N., Miller W.B. (1990)** Carbohydrate and amino acid composition of phloem sap and honeydew produced by *Bemisia tabaci*. *Journal of insect physiology* **36**:433–439.
- Cajka T., Fiehn O. (2014)** Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *Trends in analytical chemistry* **61**:192–206.
- Cavill R., Jennen D., Kleinjans J., Briedé J.J. (2016)** Transcriptomic and metabolomic data integration. *Briefings in bioinformatics* **17**:891–901.
- Cazzonelli C.I., Pogson B.J. (2010)** Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in plant science* **15**:266–274.
- Chaffei C., Pageau K., Suzuki A., Gouia H., Ghorbel M.H., Masclaux-Daubresse C. (2004)** Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy. *Plant and cell physiology* **45**:1681–1693.
- Chalhoub B., Denoeud F., Liu S., Parkin I.A.P., Tang H., Wang X., Chiquet J., Belcram H., Tong C., Samans B., Corr ea M., Da Silva C., Just J., Falentin C., Koh C.S., Le Clainche I., Bernard M., Bento P., Noel B., Labadie K., Alberti A., Charles M., Arnaud D., Guo H., Daviaud C., Alamery S., Jabbari K., Zhao M., Edger P.P., Chelaifa H., Tack D., Lassalle G., Mestiri I., Schnel N., Le Paslier M.-C., Fan G., Renault V., Bayer P.E., Golicz A.A., Manoli S., Lee T.-H., Thi V.H.D., Chalabi S., Hu Q., Fan C., Tollenaere R., Lu Y., Battail C., Shen J., Sidebottom C.H.D., Wang X., Canaguier A., Chauveau A., B rard A., Deniot G., Guan M., Liu Z., Sun F., Lim**

Y.P., Lyons E., Town C.D., Bancroft I., Wang X., Meng J., Ma J., Pires J.C., King G.J., Brunel D., Delourme R., Renard M., Aury J.-M., Adams K.L., Batley J., Snowdon R.J., Tost J., Edwards D., Zhou Y., Hua W., Sharpe A.G., Paterson A.H., Guan C., Wincker P. (2014) Plant genetics. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science* **345**:950–953.

Chambers M.C., Maclean B., Burke R., Amodèi D., Ruderman D.L., Neumann S., Gatto L., Fischer B., Pratt B., Egertson J., Hoff K., Kessner D., Tasman N., Shulman N., Frewen B., Baker T.A., Brusniak M.-Y., Paulse C., Creasy D., Flashner L., Kani K., Moulding C., Seymour S.L., Nuwaysir L.M., Lefebvre B., Kuhlmann F., Roark J., Rainer P., Detlev S., Hemenway T., Huhmer A., Langridge J., Connolly B., Chadick T., Holly K., Eckels J., Deutsch E.W., Moritz R.L., Katz J.E., Agus D.B., MacCoss M., Tabb D.L., Mallick P. (2012) A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature biotechnology* **30**:918–920.

Chapin L.J., Jones M.L. (2009) Ethylene regulates phosphorus remobilization and expression of a phosphate transporter (PhPT1) during *Petunia corolla* senescence. *Journal of experimental botany* **60**:2179–2190.

Chen S., Petersen B.L., Olsen C.E., Schulz A., Halkier B.A. (2001) Long-distance phloem transport of glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **127**:194–201.

Chen X., Truksa M., Shah S., Weselake R.J. (2010) A survey of quantitative real-time polymerase chain reaction internal reference genes for expression studies in *Brassica napus*. *Analytical biochemistry* **405**:138–140.

Choi H.-K., Choi Y.H., Verberne M., Lefebvre A.W.M., Erkelens C., Verpoorte R. (2004) Metabolic fingerprinting of wild type and transgenic tobacco plants by ¹H NMR and multivariate analysis technique. *Phytochemistry* **65**:857–864.

Chrobok D., Law S.R., Brouwer B., Lindén P., Ziolkowska A., Liebsch D., Narsai R., Szal B., Moritz T., Rouhier N., Whelan J., Gardeström P., Keech O. (2016) Dissecting the metabolic role of mitochondria during developmental leaf senescence. *Plant physiology* **172**:2132–2153.

Clément G., Moison M., Soulay F., Reisdorf-Cren M., Masclaux-Daubresse C. (2018) Metabolomics of laminae and midvein during leaf senescence and source–sink metabolite management in *Brassica napus* L. leaves. *Journal of experimental botany* **69**:891–903.

Clossais-Besnard N., Larher F. (1991) Physiological role of glucosinolates in *Brassica napus*. Concentration and distribution pattern of glucosinolates among plant organs during a complete life cycle. *Journal of the science of food and agriculture* **56**:25–38.

Cohen S.A., Michaud D.P. (1993) Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry* **211**:279–287.

Considine E.C., Thomas G., Boulesteix A.L., Khashan A.S., Kenny L.C. (2017) Critical review of reporting of the data analysis step in metabolomics. *Metabolomics* **14**:7 <https://doi.org/10.1007/s11306-017-1299-3>

- Corbesier L., Bernier G., Périlleux C. (2002)** C:N ratio increases in the phloem sap during floral transition of the long-day plants *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant and cell physiology* **43**:684–688.
- Cornish-Bowden A., Cárdenas M.L. (2012)** *Technological and medical implications of metabolic control analysis*. NATO Science series.
- Cottret L., Wildridge D., Vinson F., Barrett M.P., Charles H., Sagot M.-F., Jourdan F. (2010)** MetExplore: a web server to link metabolomic experiments and genome-scale metabolic networks. *Nucleic acids research* **38**:W132–7.
- Cramer N. (1993)** Umweltverträglichkeit der N-versorgung des rapses. *Raps* **11**:4–7.
- De Leo P., Sacher J.A. (1970)** Control of ribonuclease and acid phosphatase by auxin and abscisic acid during senescence of *Rhoeo* leaf sections. *Plant physiology* **46**:806–811.
- 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.
- De Vos R.C.H., Moco S., Lommen A., Keurentjes J.J.B., Bino R.J., Hall R.D. (2007)** Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature protocols* **2**:778–791.
- 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 thaliana*. *Plant cell physiology* **47**:74–83.
- Diepenbrock W. (2000)** Yield analysis of winter oilseed rape (*Brassica napus L.*): a review. *Field crops research* **67**:35–49.
- Dieuaide-Noubhani M., Alonso A.-P., Rolin D., Eisenreich W., Raymond P. (2007)** Metabolic flux analysis: recent advances in carbon metabolism in plants. *EXS* **97**:213–243.
- Di Guida R., Engel J., Allwood J.W., Weber R.J.M., Jones M.R., Sommer U., Vian M.R. (2016)** Non-targeted UHPLC-MS metabolomic data processing methods: a comparative investigation of normalisation, missing value imputation, transformation and scaling. *Metabolomics* **12**:93 <http://link.springer.com/article/10.1007/s11306-016-1030-9>
- Dinant S., Bonnemain J.-L., Girousse C., Kehr J. (2010)** Phloem sap intricacy and interplay with aphid feeding. *Comptes rendus biologies* **333**:504–515.
- Dinkeloo K., Boyd S., Pilot G. (2018)** Update on amino acid transporter functions and on possible amino acid sensing mechanisms in plants. *Seminars in cell and developmental biology* **74**:105–113.
- Dubousset L., Abdallah M., Desfeux A.S., Etienne P., Meuriot F., Hawkesford M.J., Gombert J., Ségura R., Bataillé M.-P., Rézé S., Bonnefoy J., Ameline A.F., Ourry A., Le Dily F., Avice J.C. (2009)** Remobilization of leaf S compounds and senescence in

response to restricted sulphate supply during the vegetative stage of oilseed rape are affected by mineral N availability. *Journal of experimental botany* **60**:3239–3253.

Dudzik D., Barbas-Bernardos C., García A., Barbas C. (2018) Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics. a review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **147**:149–173.

Dunn W.B., Broadhurst D., Begley P., Zelena E., Francis-McIntyre S., Anderson N., Brown M., Knowles J.D., Halsall A., Haselden J.N., Nicholls A.W., Wilson I.D., Kell D.B., Goodacre R., Human Serum Metabolome (HUSERMET) Consortium (2011) Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature protocols* **6**:1060–1083.

Dunn W.B., Ellis D.I. (2005) Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends in analytical chemistry* **24**:285–294.

Dunn W.B., Erban A., Weber R.J.M., Creek D.J., Brown M., Breitling R., Hankemeier T., Goodacre R., Neumann S., Kopka J., Viant M.R. (2013) Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics* **9**:44–66.

Dunn W.B., Wilson I.D., Nicholls A.W., Broadhurst D. (2012) The importance of experimental design and QC samples in large-scale and MS-driven untargeted metabolomic studies of humans. *Bioanalysis* **4**:2249–2264.

Duportet X., Aggio R.B.M., Carneiro S., Villas-Bôas S.G. (2012) The biological interpretation of metabolomic data can be misled by the extraction method used. *Metabolomics* **8**:410–421.

Durbak A., Yao H., McSteen P. (2012) Hormone signaling in plant development. *Current opinion in plant biology* **15**:92–96.

Dyer T.A., Osborne D.J. (1971) Leaf Nucleic Acids: II. Metabolism during senescence and the effect of kinetin. *Journal of experimental botany* **22**:552–560.

Edmands W.M.B., Gooderham N.J., Holmes E., Mitchell S.C. (2013) S-Methyl-L-cysteine sulfoxide: the Cinderella phytochemical? *Toxicology research* **2**:11–22.

Efroni I., Eshed Y., Lifschitz E. (2010) Morphogenesis of simple and compound leaves: a critical review. *The Plant cell* **22**:1019–1032.

Eom J.-S., Chen L.-Q., Sosso D., Julius B.T., Lin I.W., Qu X.-Q., Braun D.M., Frommer W.B. (2015) SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Current opinion in plant biology* **25**:53–62.

Eriksson L. (1999) Introduction to multi-and megavariate data analysis using projection methods (PCA & PLS). Umeå : Umetrics.

Espinoza C., Degenkolbe T., Caldana C., Zuther E., Leisse A., Willmitzer L., Hinch D.K., Hannah M.A. (2010) Interaction with diurnal and circadian regulation results in dynamic metabolic and transcriptional changes during cold acclimation in *Arabidopsis*. *PloS one* **5**:e14101.

- Faës P., Deleu C., Ainouche A., Le Cahérec F., Montes E., Clouet V., Gouraud A.-M., Albert B., Orsel M., Lassalle G., Leport L., Bouchereau A., Niogret M.-F. (2015)** Molecular evolution and transcriptional regulation of the oilseed rape proline dehydrogenase genes suggest distinct roles of proline catabolism during development. *Planta* **241**:403–419.
- Faës P., Niogret M.-F., Montes E., Cahérec F.L., Bouchereau A., Deleu C. (2015)** Transcriptional profiling of genes encoding GABA-transaminases in *Brassica napus* reveals their regulation by water deficit. *Environmental and experimental botany* **116**:20–31.
- Fait A., Fromm H., Walter D., Galili G., Fernie A.R. (2008)** Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends in plant science* **13**:14–19.
- Falk K.L., Tokuhisa J.G., Gershenzon J. (2007)** The effect of sulfur nutrition on plant glucosinolate content: physiology and molecular mechanisms. *Plant biology* **9**:573–581.
- Fan S., Wang X., Li P., Zhang Q., Zhang W. (2011)** Simultaneous determination of 13 phytohormones in oilseed rape tissues by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry and the evaluation of the matrix effect. *Journal of separation science* **34**:640–650.
- Farrow S.C., Emery R.N. (2012)** Concurrent profiling of indole-3-acetic acid, abscisic acid, and cytokinins and structurally related purines by high-performance-liquid-chromatography tandem electrospray mass spectrometry. *Plant methods* **8**:42.
- Fazli I.S., Abdin M.Z., Jamal A., Ahmad S. (2005)** Interactive effect of sulphur and nitrogen on lipid accumulation, acetyl-CoA concentration and acetyl-CoA carboxylase activity in developing seeds of oilseed crops (*Brassica campestris* L. and *Eruca sativa* Mill.). *Plant science* **168**:29–36.
- Fellows R.J., Geiger D.R. (1974)** Structural and physiological changes in sugar beet leaves during sink to source conversion. *Plant physiology* **54**:877–885.
- Fleming A.J. (2005)** Formation of primordia and phyllotaxy. *Current opinion in plant biology* **8**:53–58.
- Fletcher R.A., Adedipe N.O. (1972)** Hormonal regulation of leaf senescence in intact plants. *Plant Growth Substances 1970* pp 571–580.
- Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. (1957)** A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry* **226**:497–509.
- Font R., del Río-Celestino M., de Haro-Bailón A. (2006)** The use of near-infrared spectroscopy (NIRS) in the study of seed quality components in plant breeding programs. *Industrial crops and products* **24**:307–313.
- Foster A.S. (1936)** Leaf differentiation in angiosperms. *The Botanical review* **2**:349–372.
- Foster R., Williamson C.S., Lunn J. (2009)** Culinary oils and their health effects. *Nutrition bulletin* **34**:4–47.

- Frank L.L. (1957)** *Diabetes mellitus* in the texts of old Hindu medicine (Charaka, Susruta, Vagbhata). *The American journal of gastroenterology* **27**:76–95.
- Fukushima A., Kusano M. (2013)** Recent progress in the development of metabolome databases for plant systems biology. *Frontiers in plant science* **4**:73.
- Funck D., Eckard S., Müller G. (2010)** Non-redundant functions of two proline dehydrogenase isoforms in *Arabidopsis*. *BMC plant biology* **10**:70.
- Gabelica V., Marklund E. (2018)** Fundamentals of ion mobility spectrometry. *Current opinion in chemical biology* **42**:51–59.
- Garcia-Hernandez M., Berardini T.Z., Chen G., Crist D., Doyle A., Huala E., Knee E., Lambrecht M., Miller N., Mueller L.A., Mundodi S., Reiser L., Rhee S.Y., Scholl R., Tacklind J., Weems D.C., Wu Y., Xu I., Yoo D., Yoon J., Zhang P. (2002)** TAIR: a resource for integrated *Arabidopsis* data. *Functional & integrative genomics* **2**:239–253.
- Gaudin Z., Cerveau D., Marnet N., Bouchereau - Analytical ... A., 2014 (2014)** Robust method for investigating nitrogen metabolism of ¹⁵N labeled amino acids using AccQ•Tag ultra performance liquid chromatography-photodiode array-electrospray ionization-mass spectrometry: application to a parasitic plant. *Analytical chemistry* **82**:1138-1142.
- Giacomoni F., Le Corguillé G., Monsoor M., Landi M., Pericard P., Pétéra M., Duperier C., Tremblay-Franco M., Martin J.-F., Jacob D., Goulitquer S., Thévenot E.A., Caron C. (2015)** Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinformatics* **31**:1493–1495.
- Giavalisco P., Li Y., Matthes A., Eckhardt A. (2011)** Elemental formula annotation of polar and lipophilic metabolites using ¹³C, ¹⁵N and ³⁴S isotope labelling, in combination with high-resolution mass spectrometry. *The Plant* [online] URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-313X.2011.04682.x/full>
- Giddings J.C. (1964)** Comparison of the theoretical limit of separating ability in gas and liquid chromatography. *Analytical chemistry* **36**:1890–1892.
- Girondé A., Poret M., Etienne P., Trouverie J., Bouchereau A., Le Cahérec F., Leport L., Orsel M., Niogret M.-F., Deleu C., Avicé 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., Carole D., Soulay F., Masclaux-Daubresse C., Avicé J.-C. (2015b)** The contrasting N management of two oilseed rape genotypes reveals the mechanisms of proteolysis associated with leaf N remobilization and the respective contributions of leaves and stems to N storage and remobilization during seed filling. *BMC plant biology* **15**:59.
- Girousse C., Bournoville R., Bonnemain J.L. (1996)** Water deficit-induced changes in concentrations in proline and some other amino acids in the phloem sap of *Alfalfa*. *Plant physiology* **111**:109–113.

- 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.
- Gonzalez N., Vanhaeren H., Inzé D. (2012)** Leaf size control: complex coordination of cell division and expansion. *Trends in plant science* **17**:332–340.
- Good A.G., Johnson S.J., De Pauw M., Carroll R.T., Savidov N., Vidmar J., Lu Z., Taylor G., Stroehler V. (2007)** Engineering nitrogen use efficiency with alanine aminotransferase. *Canadian journal of botany* **85**:252–262.
- Gorrochategui E., Jaumot J., Lacorte S., Tauler R. (2016)** Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. *Trends in analytical chemistry* **82**:425–442.
- van der Graaff E., Schwacke R., Schneider A., Desimone M., Flügge 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.
- Grabov A. (2007)** Plant KT/KUP/HAK potassium transporters: single family - multiple functions. *Annals of botany* **99**:1035–1041.
- Grapov D., Wanichthanarak K., Fiehn O. (2015)** MetaMapR: pathway independent metabolomic network analysis incorporating unknowns. *Bioinformatics* **31**:2757–2760.
- 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.
- Griffiths J. (2008)** A brief history of mass spectrometry. *Analytical chemistry* **80**:5678–5683.
- Gromski P.S., Muhamadali H., Ellis D.I., Xu Y., Correa E., Turner M.L., Goodacre R. (2015)** A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis: a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Analytica chimica acta* **879**:10–23.
- Großkinsky D.K., Syaifullah S.J., Roitsch T. (2018)** Integration of multi-omics techniques and physiological phenotyping within a holistic phenomics approach to study senescence in model and crop plants. *Journal of experimental botany* **69**:825–844.
- Grubb C.D., Abel S. (2006)** Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in plant science* **11**:89–100.
- Guiboileau A., Sormani R., Meyer C., Masclaux-Daubresse C. (2010)** Senescence and death of plant organs: nutrient recycling and developmental regulation. *Comptes rendus biologiques* **333**:382–391.
- Guiboileau A., Yoshimoto K., Soulay F. (2012)** Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-plant level under both limiting and ample nitrate conditions in *Arabidopsis*. *New phytologist* <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04084.x>
- Guo Y., Cai Z., Gan S. (2004)** Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant, cell and environment* **27**:521–549.

- Gupta S.K., Pratap A. (2007)** History, origin, and evolution. *Advances in Botanical Research* **45**:1–20.
- Hartmann T. (2007)** From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **68**:2831–2846.
- Havé M., Marmagne A., Chardon F., Masclaux-Daubresse C. (2017)** Nitrogen remobilization during leaf senescence: lessons from *Arabidopsis* to crops. *Journal of experimental botany* **68**:2513–2529.
- Hayashi H., Chino M. (1986)** Collection of pure phloem sap from wheat and its chemical composition. *Plant and cell physiology* **27**:1387–1393.
- Hayashi F., Ichino T., Osanai M., Wada K. (2000)** Oscillation and regulation of proline content by P5CS and ProDH gene expressions in the light/dark cycles in *Arabidopsis thaliana* L. *Plant and cell physiology* **41**:1096–1101.
- Haydon M.J., Bell L.J., Webb A.A.R. (2011)** Interactions between plant circadian clocks and solute transport. *Journal of experimental botany* **62**:2333–2348.
- He H., Liang G., Li Y., Wang F., Yu D. (2014)** Two young MicroRNAs originating from target duplication mediate nitrogen starvation adaptation via regulation of glucosinolate synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology* **164**:853–865.
- Hijaz F., Killiny N. (2014)** Collection and chemical composition of phloem sap from *Citrus sinensis* L. Osbeck (sweet orange). *PloS one* **9**:e101830.
- Hildebrandt T.M., Nunes Nesi A., Araújo W.L., Braun H.-P. (2015)** Amino acid catabolism in plants. *Molecular plant* **8**:1563–1579.
- Himelblau E., Amasino R.M. (2001)** Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *Journal of plant physiology* **158**:1317–1323.
- Hirai M.Y., Yano M., Goodenowe D.B., Kanaya S., Kimura T., Awazuhara M., Arita M., Fujiwara T., Saito K. (2004)** Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* **101**:10205–10210.
- Hoagland D.R., Arnon D.I. (1938)** *The water-culture method for growing plants without soil*. University of California.
- Hogge L.R., Reed D.W., Underhill E.W., Haughn G.W. (1988)** HPLC separation of glucosinolates from leaves and seeds of *Arabidopsis thaliana* and their identification using thermospray liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of chromatographic science* **26**:551–556.
- Hörtensteiner S. (2006)** Chlorophyll degradation during senescence. *Annual review of plant biology* **57**:55–77.
- Hörtensteiner S., Feller U. (2002)** Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of experimental botany* **53**:927–937.
- Howarth J.R., Parmar S., Jones J., Shepherd C.E., Corol D.-I., Galster A.M., Hawkins N.D., Miller S.J., Baker J.M., Verrier P.J., Ward J.L., Beale M.H., Barraclough**

- P.B., Hawkesford M.J. (2008)** Co-ordinated expression of amino acid metabolism in response to N and S deficiency during wheat grain filling. *Journal of experimental botany* **59**:3675–3689.
- Izumi M., Tsunoda H., Suzuki Y., Makino A., Ishida H. (2012)** RBCS1A and RBCS3B, two major members within the Arabidopsis RBCS multigene family, function to yield sufficient Rubisco content for leaf photosynthetic capacity. *Journal of experimental botany* **63**:2159–2170.
- 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.
- Jackson G.D. (2000)** Effects of nitrogen and sulfur on canola yield and nutrient uptake. *Agronomy journal* **92**:644–649.
- Jeong M.L., Jiang H., Chen H.-S., Tsai C.-J., Harding S.A. (2004)** Metabolic profiling of the sink-to-source transition in developing leaves of quaking aspen. *Plant physiology* **136**:3364–3375.
- Jibrán R., A Hunter D., P Dijkwel 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.M., 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 H.-C., Sturre M.J.G., Hille J., Dijkwel P.P. (2002)** *Arabidopsis* onset of leaf death mutants identify a regulatory pathway controlling leaf senescence. *The Plant journal* **32**:51–63.
- Johnson H.E., Broadhurst D., Goodacre R., Smith A.R. (2003)** Metabolic fingerprinting of salt-stressed tomatoes. *Phytochemistry* **62**:919–928.
- Jørgensen M.E., Nour-Eldin H.H., Halkier B.A. (2015)** Transport of defense compounds from source to sink: lessons learned from glucosinolates. *Trends in plant science* **20**:508–514.
- Kalve S., De Vos D., Beemster G.T.S. (2014)** Leaf development: a cellular perspective. *Frontiers in plant science* **5**:362.
- Kanehisa M., Goto S. (2000)** KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research* **28**:27–30.
- Kassambara A., Mundt - R package version F. (2016)** Factoextra: extract and visualize the results of multivariate data analyses.
- Kaur-Sawhney R., Galston A.W. (1979)** Interaction of polyamines and light on biochemical processes involved in leaf senescence. *Plant, cell and environment* **2**:189–196.
- Kell D.B. (2004)** Metabolomics and systems biology: making sense of the soup. *Current opinion in microbiology* **7**:296–307.

- Khan M., Rozhon W., Poppenberger B. (2014)** The role of hormones in the aging of plants- a mini-review. *Gerontology* **60**:49-55
- Kim H., Kaown D., Mayer B., Lee J.-Y., Hyun Y., Lee K.-K. (2015)** Identifying the sources of nitrate contamination of groundwater in an agricultural area (Hae-an basin, Korea) using isotope and microbial community analyses. *The Science of the total environment* **533**:566–575.
- Kim J.A., Kim H.-S., Choi S.-H., Jang J.-Y., Jeong M.-J., Lee S.I. (2017)** The Importance of the Circadian Clock in Regulating Plant Metabolism. *International journal of molecular sciences* **18**:2680.
- Kim J., Kim J.H., Lyu J.I., Woo H.R., Lim P.O. (2018)** New insights into the regulation of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany* **69**:787–799.
- 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.
- Kishor P.B.K., Sangam S., Amrutha R.N., Laxmi P.S., Naidu K.R., Rao K.R.S.S., Rao S., Reddy K.J., Theriappan P., Sreenivasulu N. (2005)** Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current science* **88**:424–438.
- Kiyosue T., Yoshida Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1996)** A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **8**:1323–1335.
- Klie S., Krueger S., Krall L., Giavalisco P., Flügge U.-I., Willmitzer L., Steinhauser D. (2011)** Analysis of the compartmentalized metabolome--a validation of the non-aqueous fractionation technique. *Frontiers in plant science* **2**:55.
- Koeslin-Findeklee F., Horst W.J. (2016)** Contribution of nitrogen uptake and retranslocation during reproductive growth to the nitrogen efficiency of winter oilseed-rape cultivars (*Brassica napus L.*) differing in leaf senescence. *Agronomy* **6**:1.
- Koeslin-Findeklee F., Rizi V.S., Becker M.A., Parra-Londono S., Arif M., Balazadeh S., Mueller-Roeber B., Kunze R., Horst W.J. (2015)** Transcriptomic analysis of nitrogen starvation- and cultivar-specific leaf senescence in winter oilseed rape (*Brassica napus L.*). *Plant science* **233**:174–185.
- Kogel K.-H., Voll L.M., Schäfer P., Jansen C., Wu Y., Langen G., Imani J., Hofmann J., Schmiedl A., Sonnewald S., von Wettstein D., Cook R.J., Sonnewald U. (2010)** Transcriptome and metabolome profiling of field-grown transgenic barley lack induced differences but show cultivar-specific variances. *PNAS* **107**:6198–6203.
- Kojima S., Bohner A., Gassert B., Yuan L., von Wirén N. (2007)** AtDUR3 represents the major transporter for high-affinity urea transport across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots. *The Plant journal* **52**:30–40.
- 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. (2015)** Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Current opinion in plant biology* **25**:115–122.
- Krueger S., Steinhauser D., Lisec J., Giavalisco P. (2014)** Analysis of subcellular metabolite distributions within *Arabidopsis thaliana* leaf tissue: a primer for subcellular metabolomics. *Methods in molecular biology* **1062**:575–596.
- Kruger N.J., Ratcliffe R.G. (2009)** Insights into plant metabolic networks from steady-state metabolic flux analysis. *Biochimie* **91**:697–702.
- Krul W.R. (1974)** Nucleic Acid and protein metabolism of senescing and regenerating soybean cotyledons. *Plant physiology* **54**:36–40.
- Krumsiek J., Bartel J., Theis F.J. (2016)** Computational approaches for systems metabolomics. *Current opinion in biotechnology* **39**:198–206.
- Kuhl C., Tautenhahn R., Böttcher C., Larson T.R., Neumann S. (2012)** CAMERA: an integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets. *Analytical chemistry* **84**:283–289.
- Larher F.R., Aziz A., Gibon Y., Trotel-Aziz P., Sulpice R., Bouchereau A. (2003)** An assessment of the physiological properties of the so-called compatible solutes using in vitro experiments with leaf discs. *Plant physiology and biochemistry* **41**:657–666.
- Larher F.R., Gagneul D., Niogret M.-F., Emery N., Monnier C., Maerskalck V., Quillien G., Lefort C., Plasman M., Bouchard F., Bouchereau A. (2013)** Potentiation of proline accumulation in oilseed rape leaf discs exogenously supplied with combinations of PEG and cryoprotective agents is associated with overproduction of ABA. *Environmental and experimental botany* **87**:167–178.
- Lassaletta L., Billen G., Grizzetti B., Anglade J., Garnier J. (2014)** 50 year trends in nitrogen use efficiency of world cropping systems: the relationship between yield and nitrogen input to cropland. *Environmental research letters* **9**:105011.
- Lastdrager J., Hanson J., Smeekens S. (2014)** Sugar signals and the control of plant growth and development. *Journal of experimental botany* **65**:799–807.
- Lehmann S., Funck D., Szabados L., Rentsch D. (2010)** Proline metabolism and transport in plant development. *Amino acids* **39**:949–962.
- Lê S., Josse J., Husson (2008)** FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *Journal of statistical software* **25**:1.
- Lemoine R., La Camera S., Atanassova R., Dédaldéchamp F., Allario T., Pourtau N., Bonnemain J.-L., Laloi M., Coutos-Thévenot P., Maurousset L., Faucher M., Girousse C., Lemonnier P., Parrilla J., Durand M. (2013)** Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in plant science* **4**:272.
- Lers A., Sonogo L., Green P.J., Burd S. (2006)** Suppression of LX ribonuclease in tomato results in a delay of leaf senescence and abscission. *Plant physiology* **142**:710–721.
- Liang X., Zhang L., Natarajan S.K., Becker D.F. (2013)** Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants and redox signaling* **19**:998–1011.

- Libiseller G., Dvorzak M., Kleb U., Gander E., Eisenberg T., Madeo F., Neumann S., Trausinger G., Sinner F., Pieber T., Magnes C. (2015a)** IPO: a tool for automated optimization of XCMS parameters. *BMC bioinformatics* **16**:118.
- Lim P.O., Kim H.J., Nam H.G. (2007)** Leaf senescence. *Annual review of plant biology* **58**:115–136.
- Lim P.O., Lee I.C., Kim J., Kim H.J., Ryu J.S., Woo H.R., Nam H.G. (2010)** Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. *Journal of experimental botany* **61**:1419–1430.
- Lim P.O., Nam H.G. (2007)** Aging and senescence of the leaf organ. *Journal of plant biology* **50**:291–300.
- Liu J., Wu Y.H., Yang J.J., Liu Y.D., Shen F.F. (2008)** Protein degradation and nitrogen remobilization during leaf senescence. *Journal of plant biology* **51**:11–19.
- Li Z.-X., Yang W.-J., Ahammed G.J., Shen C., Yan P., Li X., Han W.-Y. (2016)** Developmental changes in carbon and nitrogen metabolism affect tea quality in different leaf position. *Plant physiology and biochemistry* **106**:327–335.
- Li W., Zhang H., Li X., Zhang F., Liu C., Du Y., Gao X., Zhang Z., Zhang X., Hou Z., Zhou H., Sheng X., Wang G., Guo Y. (2017)** Intergrative metabolomic and transcriptomic analyses unveil nutrient remobilization events in leaf senescence of tobacco. *Scientific reports* **7**:12126.
- Li Z., Zhao Y., Liu X., Jiang Z., Peng J., Jin J., Guo H., Luo J. (2017)** Construction of the leaf senescence database and functional assessment of senescence-associated genes. *Plant genomics databases: methods and protocols* pp 315–333.
- 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.
- Lugan R., Niogret M.-F., Kervazo L., Larher F.R., Kopka J., Bouchereau A. (2009)** Metabolome and water status phenotyping of *Arabidopsis* under abiotic stress cues reveals new insight into ESK1 function. *Plant, cell and environment* **32**:95–108.
- Madan S., Nainawatee H.S., Jain S., Jain R.K., Malik M.S., Chowdhury J.B. (1994)** Leaf position-dependent changes in proline, pyrroline-5-carboxylate reductase activity and water relations under salt-stress in genetically stable salt-tolerant somaclones of *Brassica juncea* L. *Plant and soil* **163**:151–156.
- Maillard A., Diquélou S., Billard V., Laine P., Garnica M., Prudent M., Garcia-Mina J.-M., Yvin J.-C., Ourry A. (2015)** Leaf mineral nutrient remobilization during leaf senescence and modulation by nutrient deficiency. *Frontiers in plant science* **6**:317.
- Majumdar R., Barchi B., Turlapati S.A., Gagne M., Minocha R., Long S., Minocha S.C. (2016)** Glutamate, ornithine, arginine, proline, and polyamine metabolic interactions: The pathway is regulated at the post-transcriptional level. *Frontiers in plant science* **7**:78.
- Malagoli P., Laine P., Rossato L., Ourry A. (2005)** Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to

harvest: I. Global N flows between vegetative and reproductive tissues in relation to leaf fall and their residual N. *Annals of botany* **95**:853–861.

Mao C., Lu S., Lv B., Zhang B., Shen J., He J., Luo L., Xi D., Chen X., Ming F. (2017) A rice NAC transcription factor promotes leaf senescence via ABA biosynthesis. *Plant physiology* **174**:1747–1763.

Marshall R.S., Vierstra R.D. (2018) Autophagy: the master of bulk and selective recycling. Annual review of plant biology [online] URL: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040606>

Martin A.J.P. (1948) Partition chromatography. *Annals of the New York Academy of Sciences* **49**:249–264.

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.

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*. *The Plant cell* **26**:1857–1877.

Masclaux-Daubresse C., Daniel-Vedele F., Dechorgnat J., Chardon F., Gaufichon L., Suzuki A. (2010) Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of botany* **105**:1141–1157.

Masclaux-Daubresse C., Reisdorf-Cren M., 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 C., Valadier M.H., Brugière N., Morot-Gaudry J.F., Hirel B. (2000) Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* **211**:510–518.

Matallana-Ramirez L.P., Rauf M., Farage-Barhom S., Dortay H., Xue G.-P., Dröge-Laser W., Lers A., Balazadeh S., Mueller-Roeber B. (2013) NAC transcription factor ORE1 and senescence-induced BIFUNCTIONAL NUCLEASE1 (BFN1) constitute a regulatory cascade in *Arabidopsis*. *Molecular plant* **6**:1438–1452.

Meng Q., Siebke K., Lippert P., Baur B., Mukherjee U., Weis E. (2001) Sink–source transition in tobacco leaves visualized using chlorophyll fluorescence imaging. *The New phytologist* **151**:585–595.

Merritt S.Z. (1996) Within-plant variation in concentrations of amino acids, sugar, and sinigrin in phloem sap of black mustard, *Brassica nigra (L.) Koch (Cruciferae)*. *Journal of chemical ecology* **22**:1133–1145.

Miller A.J., Fan X., Orsel M., Smith S.J., Wells D.M. (2007) Nitrate transport and signalling. *Journal of experimental botany* **58**:2297–2306.

- Misra B.B. (2018)** New tools and resources in metabolomics: 2016-2017. Electrophoresis [online] URL: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201700441>
- 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.
- Mora-García S., de Leone M.J., Yanovsky M. (2017)** Time to grow: circadian regulation of growth and metabolism in photosynthetic organisms. *Current opinion in plant biology* **35**:84–90.
- Moschen S., Higgins J., Di Rienzo J.A., Heinz R.A., Paniego N., Fernandez P. (2016)** Network and biosignature analysis for the integration of transcriptomic and metabolomic data to characterize leaf senescence process in sunflower. *BMC bioinformatics* **17**:174.
- Mudge S.R., Rae A.L., Diatloff E., Smith F.W. (2002)** Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *The Plant journal* **31**:341–353.
- Munné-Bosch S., Alegre L. (2002)** Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. *Planta* **214**:608–615.
- Nguyen S.T.T., McCurdy D.W. (2015)** High-resolution confocal imaging of wall ingrowth deposition in plant transfer cells: Semi-quantitative analysis of phloem parenchyma transfer cell development in leaf minor veins of *Arabidopsis*. *BMC plant biology* **15**:109.
- Noh Y.S., Amasino R.M. (1999)** Regulation of developmental senescence is conserved between *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant molecular biology* **41**:195–206.
- 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.
- Obata T., Fernie A.R. (2012)** The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cellular and molecular life sciences* **69**:3225–3243.
- O'Brien J.A., Vega A., Bouguyon E., Krouk G., Gojon A., Coruzzi G., Gutiérrez R.A. (2016)** Nitrate transport, sensing, and responses in plants. *Molecular plant* **9**:837–856.
- Oliveira I.C., Brears T., Knight T.J., Clark A., Coruzzi G.M. (2002)** Overexpression of cytosolic glutamine synthetase. Relation to nitrogen, light, and photorespiration. *Plant physiology* **129**:1170–1180.
- Pages X., Morin O., Birot C., Gaud M., Fazeuilh S., Gouband M. (2010)** Raffinage des huiles et des corps gras et élimination des contaminants. *Oleagineux, Corps Gras, Lipides* **17**:86–99.
- Pan X., Welti R., Wang X. (2008)** Simultaneous quantification of major phytohormones and related compounds in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* **69**:1773–1781.
- Pan X., Xiangqing P., Ruth W., Xuemin W. (2010)** Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Nature protocols* **5**:986–992.

- Pate J.S. (1973)** Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. *Soil biology and biochemistry* **5**:109–119.
- Pate J., Shedley E., Arthur D., Adams M. (1998)** Spatial and temporal variations in phloem sap composition of plantation-grown *Eucalyptus globulus*. *Oecologia* **117**:312–322.
- Pedreschi R., Hertog M.L.A.T.M., Carpentier S.C., Lammertyn J., Robben J., Noben J.-P., Panis B., Swennen R., Nicolai B.M. (2008)** Treatment of missing values for multivariate statistical analysis of gel-based proteomics data. *Proteomics* **8**:1371–1383.
- Penfold C.A., Buchanan-Wollaston V. (2014)** Modelling transcriptional networks in leaf senescence. *Journal of experimental botany* **65**:3859–3873.
- Peng C. (2015)** *Discoveries of pathway and regulation of branched-chain amino acid catabolism in Arabidopsis thaliana revealed through transcript and genetic studies*. PhD, Michigan State University.
- Peoples M.B., Dalling M.J. (1988)** The interplay between proteolysis and amino acid metabolism during senescence and nitrogen reallocation. *Senescence and aging in plants* 181–217.
- Pérez-Amador M.A., Abler M.L., De Rocher E.J., Thompson D.M., van Hoof A., LeBrasseur N.D., Lers A., Green P.J. (2000)** Identification of BFN1, a bifunctional nuclease induced during leaf and stem senescence in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **122**:169–180.
- 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.
- Pratelli R., Pilot G. (2014)** Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. *Journal of experimental botany* **65**:5535–5556.
- Purcell E.M., Torrey H.C., Pound R.V. (1946)** Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Physical Review* **69**:37–38.
- Rafiei A., Sleno L. (2015)** Comparison of peak-picking workflows for untargeted liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry metabolomics data analysis. *Rapid communications in mass spectrometry* **29**:119–127.
- Ratcliffe R.G., Shachar-Hill Y. (2006)** Measuring multiple fluxes through plant metabolic networks. *The Plant journal* **45**:490–511.
- Rathke G., 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.
- 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.
- Rawlings N.D., Barrett A.J., Finn R. (2016)** Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research* **44**:D343–50.

- Reddy P.S., Veeranjanyulu K. (1991)** Proline metabolism in senescing leaves of horsegram (*Macrotyloma uniflorum Lam.*). *Journal of plant physiology* **137**:381–383.
- Reich M., Aghajanzadeh T., De Kok L.J. (2014)** Physiological Basis of Plant Nutrient Use Efficiency – Concepts, Opportunities and Challenges for Its Improvement. *Plant Ecophysiology* **10**:1-27.
- Renault H., Roussel V., El Amrani A., Arzel M., Renault D., Bouchereau A., Deleu C. (2010)** The *Arabidopsis* pop2-1 mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance. *BMC plant biology* **10**:20.
- Rhee S.Y., Zhang P., Foerster H., Tissier (2006)** AraCyc: overview of an *Arabidopsis* metabolism database and its applications for plant research. *Plant metabolomics* 141-154.
- Riens B., Lohaus G., Heineke D., Heldt H.W. (1991)** Amino acid and sucrose content determined in the cytosolic, chloroplastic, and vacuolar compartments and in the phloem sap of spinach leaves. *Plant physiology* **97**:227–233.
- Roach D.A. (1993)** Evolutionary senescence in plants. *Genetica* **91**:53–64.
- Roberts I.N., Caputo C., Criado M.V. (2012)** Senescence-associated proteases in plants. *Physiologia plantarum* **145**:130-9.
- Robinson W.D., Carson I., Ying S., Ellis K., Plaxton W.C. (2012)** Eliminating the purple acid phosphatase AtPAP26 in *Arabidopsis thaliana* delays leaf senescence and impairs phosphorus remobilization. *The New phytologist* **196**:1024–1029.
- Rochat C., Boutin J.-P. (1991)** Metabolism of phloem-borne amino acids in maternal tissues of *Pisum sativum L.* *Journal of experimental botany* **42**:207–214.
- Rohart F., Gautier B., Singh A., Lê Cao K.-A. (2017)** mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLoS computational biology* **13**:e1005752.
- Rossato L., Lainé P., Ourry A. (2001)** Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus L.* during the growth cycle: nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. *Journal of experimental botany* **52**:1655–1663.
- Rossi M., Bermudez L., Carrari F. (2015)** Crop yield: challenges from a metabolic perspective. *Current opinion in plant biology* **25**:79–89.
- Rothstein S.J. (2007)** Returning to our roots: making plant biology research relevant to future challenges in agriculture. *The Plant cell* **19**:2695–2699.
- Safavi-Rizi V., Franzaring J., Fangmeier A., Kunze R. (2018)** Divergent N Deficiency-Dependent Senescence and Transcriptome Response in Developmentally Old and Young *Brassica napus* Leaves. *Frontiers in plant science* **9**:48.
- Sakamoto W., Takami T. (2014)** Nucleases in higher plants and their possible involvement in DNA degradation during leaf senescence. *Journal of experimental botany* **65**:3835–3843.

- Salazar C., Armenta J.M., Cortés D.F., Shulaev V. (2012)** Combination of an AccQ Tag-Ultra performance liquid chromatographic method with tandem mass spectrometry for the analysis of amino acids. Humana Press pp, 13–28.
- Salon C., Avice J.-C., Colombié S., Dieuaide-Noubhani M., Gallardo K., Jeudy C., Ourry A., Prudent M., Voisin A.-S., Rolin D. (2017)** Fluxomics links cellular functional analyses to whole-plant phenotyping. *Journal of experimental botany* **68**:2083–2098.
- Salon C., Bataille 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* pp 335–346.
- Sanada Y., Ueda H., Kuribayashi K. (1995)** Novel light-dark change of proline levels in halophyte (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) and glycophytes (*Hordeum vulgare* L. and *Triticum aestivum* L.) leaves and roots under salt stress. *Plant and cell* **36**:965-970.
- Sana T.R., Fischer S., Wohlgemuth G., Katrekar A., Jung K.-H., Ronald P.C., Fiehn O. (2010)** Metabolomic and transcriptomic analysis of the rice response to the bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Metabolomics* **6**:451–465.
- Savage J.A., Zwieniecki M.A., Holbrook N.M. (2013)** Phloem transport velocity varies over time and among vascular bundles during early cucumber seedling development. *Plant physiology* **163**:1409–1418.
- Schertl P., Braun H.-P. (2014)** Respiratory electron transfer pathways in plant mitochondria. *Frontiers in plant science* **5**:163.
- Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.-Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. (2012)** Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* **9**:676–682.
- Schippers J.H.M. (2015)** Transcriptional networks in leaf senescence. *Current opinion in plant biology* **27**:77–83.
- 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.
- Schrimpe-Rutledge A.C., Codreanu S.G., Sherrod S.D., McLean J.A. (2016)** Untargeted metabolomics strategies — Challenges and emerging directions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **27**:1897–1905.
- Seki M., Ohara T., Hearn T.J., Frank A., da Silva V.C.H., Caldana C., Webb A.A.R., Satake A. (2017)** Adjustment of the Arabidopsis circadian oscillator by sugar signalling dictates the regulation of starch metabolism. *Scientific reports* **7**:8305.
- Singh B.N., Anantha Rao N.K. (1937)** Changes in chloroplast pigments in leaves during senescence. *Nature* **140**:728.

- Sobieszczuk-Nowicka E. (2017)** Polyamine catabolism adds fuel to leaf senescence. *Amino acids* **49**:49–56.
- Sobieszczuk-Nowicka E., Kubala S., Zmienko A., Małecka A., Legocka J. (2015)** From Accumulation to Degradation: Reprogramming Polyamine Metabolism Facilitates Dark-Induced Senescence in Barley Leaf Cells. *Frontiers in plant science* **6**:1198.
- Soga T., Heiger D.N. (2000)** Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical chemistry* **72**:1236–1241.
- Spicer R., Salek R.M., Moreno P., Cañueto D., Steinbeck C. (2017)** Navigating freely-available software tools for metabolomics analysis. *Metabolomics* **13**:106.
- Stahl A., Friedt W., Wittkop B., Snowdon R.J. (2015)** Complementary diversity for nitrogen uptake and utilisation efficiency reveals broad potential for increased sustainability of oilseed rape production. *Plant and soil* **400**:245–262.
- Steuer R. (2006)** On the analysis and interpretation of correlations in metabolomic data. *Briefings in bioinformatics* **7**:151–158.
- Stigter K.A., Plaxton W.C. (2015)** Molecular mechanisms of phosphorus metabolism and transport during leaf senescence. *Plants* **4**:773–798.
- Sturtevant D., Lee Y.-J., Chapman K.D. (2016)** Matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) for direct visualization of plant metabolites in situ. *Current opinion in biotechnology* **37**:53–60.
- Suárez M.F., Avila C., Gallardo F., Cantón F.R., García-Gutiérrez A., Claros M.G., Cánovas F.M. (2002)** Molecular and enzymatic analysis of ammonium assimilation in woody plants. *Journal of experimental botany* **53**:891–904.
- Su Y.-H., Frommer W.B., Ludewig U. (2004)** Molecular and functional characterization of a family of amino acid transporters from *Arabidopsis*. *Plant physiology* **136**:3104–3113.
- Sugimoto M., Kawakami M., Robert M., Soga T., Tomita M. (2012)** Bioinformatics tools for mass spectroscopy-based metabolomic data processing and analysis. *Current bioinformatics* **7**:96–108.
- Sulpice R., Nikoloski Z., Tschoep H., Antonio C., Kleessen S., Larhlmi A., Selbig J., Ishihara H., Gibon Y., Fernie A.R., Stitt M. (2013)** Impact of the carbon and nitrogen supply on relationships and connectivity between metabolism and biomass in a broad panel of *Arabidopsis* accessions. *Plant physiology* **162**:347–363.
- Sulpice R., Trenkamp S., Steinfath M., Usadel B., Gibon Y., Witucka-Wall H., Pyl E.-T., Tschoep H., Steinhauser M.C., Guenther M., Hoehne M., Rohwer J.M., Altmann T., Fernie A.R., Stitt M. (2010)** Network analysis of enzyme activities and metabolite levels and their relationship to biomass in a large panel of *Arabidopsis* accessions. *The Plant cell* **22**:2872–2893.
- Sumner L.W., Amberg A., Barrett D., Beale M.H., Beger R., Daykin C.A., Fan T.W.-M., Fiehn O., Goodacre R., Griffin J.L., Hankemeier T., Hardy N., Harnly J., Higashi R., Kopka J., Lane A.N., Lindon J.C., Marriott P., Nicholls A.W., Reilly M.D.,**

- Thaden J.J., Viant M.R. (2007)** Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics* **3**:211–221.
- Sunarpi, Anderson J.W. (1997)** Effect of nitrogen nutrition on remobilization of protein sulfur in the leaves of vegetative soybean and associated changes in soluble sulfur metabolites. *Plant physiology* **115**:1671–1680.
- Szabados L., Savouré A. (2010)** Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science* **15**:89–97.
- Tachibana S. (1987)** Effect of root temperature on the rate of water and nutrient absorption in cucumber cultivars and figleaf gourd. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **55**:461–467.
- Tautenhahn R., Böttcher C., Neumann S. (2008)** Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC bioinformatics* **9**:504.
- Taylor C.B., Bariola P.A., delCardayré S.B., Raines R.T., Green P.J. (1993)** RNS2: a senescence-associated RNase of *Arabidopsis* that diverged from the S-RNases before speciation. *PNAS* **90**:5118–5122.
- Tegeder M. (2012)** Transporters for amino acids in plant cells: some functions and many unknowns. *Current opinion in plant biology* **15**:315–321.
- Tegeder M. (2014)** Transporters involved in source to sink partitioning of amino acids and ureides: opportunities for crop improvement. *Journal of experimental botany* **65**:1865–1878.
- Tegeder M., Masclaux-Daubresse C. (2018)** Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. *The New phytologist* **217**:35–53.
- Tegeder M., Rentsch D. (2010)** Uptake and partitioning of amino acids and peptides. *Molecular plant* **3**:997–1011.
- Tegeder M., Ward J.M. (2012)** Molecular Evolution of Plant AAP and LHT Amino Acid Transporters. *Frontiers in plant science* **3**:21.
- Tetyuk O., Benning U.F., Hoffmann-Benning S. (2013)** Collection and analysis of *Arabidopsis* phloem exudates using the EDTA-facilitated Method. *Journal of visualized experiments: JoVE*:e51111.
- Thévenot E.A., Roux A., Xu Y., Ezan E., Junot C. (2015)** Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index, and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and OPLS statistical analyses. *Journal of proteome research* **14**:3322–3335.
- Thomas H., Huang L., Young M., Ougham H. (2009)** Evolution of plant senescence. *BMC evolutionary biology* **9**:163.
- Thomsen H.C., Eriksson D., Møller I.S., Schjoerring J.K. (2014)** Cytosolic glutamine synthetase: a target for improvement of crop nitrogen use efficiency? *Trends in plant science* **19**:656–663.

- Tian Q., Rosselot R.A., Schwartz S.J. (2005)** Quantitative determination of intact glucosinolates in broccoli, broccoli sprouts, Brussels sprouts, and cauliflower by high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry* **343**:93-99.
- 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.
- Troncoso-Ponce M.A., Cao X., Yang Z., Ohlrogge J.B. (2013)** Lipid turnover during senescence. *Plant science* **205-206**:13–19.
- Turgeon R. (1987)** Phloem unloading in tobacco sink leaves: insensitivity to anoxia indicates a symplastic pathway. *Planta* **171**:73–81.
- Turgeon R., Medville R. (2004)** Phloem loading. A reevaluation of the relationship between plasmodesmatal frequencies and loading strategies. *Plant physiology* **136**:3795–3803.
- Turgeon R., Webb J.A. (1973)** Leaf development and phloem transport in *Cucurbita pepo*: Transition from import to export. *Planta* **113**:179–191.
- Urquhart A.A., Joy K.W. (1981)** Use of Phloem exudate technique in the study of amino Acid transport in pea plants. *Plant physiology* **68**:750–754.
- Vance C.P., Uhde-Stone C., Allan D.L. (2003)** Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *The New phytologist* **157**:423–447.
- Vaniya A., Fiehn O. (2015)** Using fragmentation trees and mass spectral trees for identifying unknown compounds in metabolomics. *Trends in analytical chemistry* **69**:52–61.
- Velthof G.L., Lesschen J.P., Webb J., Pietrzak S., Miatkowski Z., Pinto M., Kros J., Oenema O. (2014)** The impact of the Nitrates Directive on nitrogen emissions from agriculture in the EU-27 during 2000-2008. *The Science of the total environment* **468**:1225–1233.
- Venekamp J.H., Koot J.T. (1984)** The Distribution of Free Amino Acids, Especially of Proline, in the Organs of Field Bean Plants, *Vicia faba L.*, during Development in the Field. *Journal of plant physiology* **116**:343–349.
- Veneklaas E.J., Lambers H., Bragg J., Finnegan P.M., Lovelock C.E., Plaxton W.C., Price C.A., Scheible W.-R., Shane M.W., White P.J., Others (2012)** Opportunities for improving phosphorus-use efficiency in crop plants. *The New phytologist* **195**:306–320.
- Verbruggen N., Hermans C. (2008)** Proline accumulation in plants: a review. *Amino acids* **35**:753–759.
- Verwoerd T.C., Dekker B.M., Hoekema A. (1989)** A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic acids research* **17**:2362.
- Viant M.R., Kurland I.J., Jones M.R., Dunn W.B. (2017)** How close are we to complete annotation of metabolomes? *Current opinion in chemical biology* **36**:64–69.
- Vinaixa M., Schymanski E.L., Neumann S., Navarro M., Salek R.M., Yanes O. (2016)** Mass spectral databases for LC/MS- and GC/MS-based metabolomics: State of the field and future prospects. *Trends in analytical chemistry* **78**:23–35.

- Wallsgrave R.M., Turner J.C., Hall N.P., Kendall A.C., Bright S.W.J. (1987)** Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase - Biochemical and genetic analysis. *Plant physiology* **83**:155–158.
- Wang S., Blumwald E. (2014)** Stress-induced chloroplast degradation in *Arabidopsis* is regulated via a process independent of autophagy and senescence-associated vacuoles. *The Plant cell* **26**:4875–4888.
- Wang Y., Liu S., Hu Y., Li P., Wan J.-B. (2015)** Current state of the art of mass spectrometry-based metabolomics studies: a review focusing on wide coverage, high throughput and easy identification. *RSC advances* **5**:78728–78737.
- Wanichthanarak K., Fahrman J.F., Grapov D. (2015)** Genomic, proteomic, and metabolomic data integration strategies. *Biomarker insights* **10**:1–6.
- 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.
- Weibull J., Ronquist F., Brishammar S. (1990)** Free amino acid composition of leaf exudates and phloem sap : a comparative study in oats and barley. *Plant physiology* **92**:222–226.
- Whittle P.J., Smith R.H., McIntosh A. (1976)** Estimation of S-methylcysteine sulfoxide (kale anaemia factor) and its distribution among brassica forage and root crops. *Journal of the science of food and agriculture* **27**:633–642.
- Wickham H. (2016)** *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer.
- Williams L.E., Lemoine R., Sauer N. (2000)** Sugar transporters in higher plants--a diversity of roles and complex regulation. *Trends in plant science* **5**:283–290.
- Wingler A., Marès M., Pourtau N. (2004)** Spatial patterns and metabolic regulation of photosynthetic parameters during leaf senescence. *The New phytologist* **161**:781-789.
- Wingler A., Purdy S.J., Edwards S.-A., Chardon F., Masclaux-Daubresse C. (2010)** QTL analysis for sugar-regulated leaf senescence supports flowering-dependent and -independent senescence pathways. *The New phytologist* **185**:420–433.
- Wingler A., Purdy S., MacLean J.A., Pourtau N. (2006)** The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *Journal of experimental botany* **57**:391–399.
- Wingler A., von Schaewen A., Leegood R.C., Lea P.J., Paul Quick W. (1998)** Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light. *Plant physiology* **116**:329–335.
- Winter H., Lohaus G., Heldt H.W. (1992)** Phloem transport of amino acids in relation to their cytosolic levels in barley leaves. *Plant physiology* **99**:996–1004.
- Woo H.R., Kim H.J., Nam H.G., Lim P.O. (2013)** Plant leaf senescence and death - regulation by multiple layers of control and implications for aging in general. *Journal of cell science* **126**:4823–4833.

- Woo H.R., Koo H.J., Kim J., Jeong H., Yang J.O., Lee I.H., Jun J.H., Choi S.H., Park S.J., Kang B., Kim Y.W., Phee B.-K., Kim J.H., Seo C., Park C., Kim S.C., Park S., Lee B., Lee S., Hwang D., Nam H.G., Lim P.O. (2016)** Programming of plant leaf senescence with temporal and inter-organellar coordination of transcriptome in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **171**:452–467.
- Yang Z., Ohlrogge J.B. (2009)** Turnover of fatty acids during natural senescence of *Arabidopsis*, *Brachypodium*, and switchgrass and in *Arabidopsis* beta-oxidation mutants. *Plant physiology* **150**:1981–1989.
- Yolcu S., Li X., Li S., Kim Y.J. (2018)** Beyond the genetic code in leaf senescence. *Journal of experimental botany* **69**:801–810.
- Zhang L., Becker D.F. (2015)** Connecting proline metabolism and signaling pathways in plant senescence. *Frontiers in plant science* **6**:552.
- Zhang W.Y., Xu Y.C., Li W.L., Yang L., Yue X., Zhang X.S., Zhao X.Y. (2014)** Transcriptional analyses of natural leaf senescence in maize. *PloS one* **9**:e115617.
- Zhang H., Zhou C. (2013)** Signal transduction in leaf senescence. *Plant molecular biology* **82**:539–545.

ANNEXES

- 1. Publications & communications scientifiques**
- 2. Activités extra-recherche**

ANNEXES

1. PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

1.1. Publications

Dechaumet S., Guitton Y., Leconte P., Rolland S., Leprince F., Marnet N., Berardocco S., Jonard C., Le Bizec B., Le Caherec F., Nesi N., Bouchereau A. (soumis à *Plant Physiology*) Metabolome reconfiguration of leaf development, sink/source transition and senescence in *Brassica napus L.*

Dechaumet S., Pellizzaro A., Bizouerne E., Marnet N., Jonard C., Berardocco S., Denis A-M., Clouet V., Niogret M-F., Bouchereau A. (en préparation) Senescence-induced proline catabolism as a source of substrates and energy for nutrient recycling processes in oilseed rape leaves.

Dechaumet S., Orsel M., Le Caherec F., Niogret M-F., Clouet V., Marnet N., Jonard C., Berardocco S., Escourrou A., Guitton Y., Girondé A., Trouverie J, Etienne P., Avice J-C., Nesi N., Bouchereau A. (en préparation) Metabolomic and transcriptomic regulation of nitrogen remobilization efficiency in two oilseed rape genotypes.

Pelé A., Falque M., Trotoux G., Eber F., Nègre S., Gilet M., Huteau V., Lodé M., Jousseume T., Dechaumet S., Morice J., Poncet C., Coriton O., Martin O.C., Rousseau-Gueutin M., Chèvre A.M. (2017) Amplifying recombination genome-wide and reshaping crossover landscapes in *Brassicac*s. *PLoS Genet.* 13: e1006794.

1.2. Communications orales

Dechaumet S., Berardocco S., Rolland S., Marnet N., Bouchereau A. - Cartographie métabolique de la progression de la sénescence foliaire chez le colza. *Journée scientifique de Biogenouest, décembre 2015 à Nantes.*

Dechaumet S., Berardocco S., Rolland S., Marnet N., Bouchereau A. - Dissection métabolique de la progression de la sénescence foliaire et de la remobilisation des nutriments chez le colza. *Journée des doctorants de l'IGEPP, mars 2015 à Le Rheu (35).*

Dechaumet S., Le Cahérec F., Leport L., Albert B., Berardocco S., Leconte P., Rolland S., Bouchereau A. - Dissection métabolique de la progression de la sénescence foliaire et de la remobilisation des nutriments chez le colza. *9ème Journées Scientifiques du Réseau Francophone de Métabolomique et de Fluxomique, juin 2015 à Lille (59).*

Dechaumet S., Berardocco S., Rolland S., Marnet N., Bouchereau A. - Metabolic signature of leaf senescence. *Réunion Annuelle du projet Rapsodyn, novembre 2015 à Rennes (35).*

Dechaumet S., Berardocco S., Rolland S., Marnet N., Bouchereau A. - Metabolic dissection of leaf senescence and nutrient remobilization in oilseed rape. *Journée des doctorants du département Biologie et Amélioration des Plantes de l'INRA, mars 2016 à Lyon (69).*

Dechaumet S., Leconte P., Bouchereau A. - L'analyse d'image au service du phénotypage. *Lab meeting d'équipe, avril 2016 à Le Rheu (35).*

Dechaumet S., Le Caherec F., Leport L., Berardocco S., Rolland S., Marnet N., Jonard C., Guitton Y., Bouchereau A. - Leaf ageing in rapeseed, a qualitative and quantitative metabolomic view. *10ème Journées Scientifiques du Réseau Francophone de Métabolomique et de Fluxomique, juin 2016 à Montpellier (34).*

Dechaumet S., Laperche A., Bouchereau A. - La gestion des données en sciences. *Lab meeting d'équipe, octobre 2016 à le Rheu (35).*

Dechaumet S., Albert B., Leport L., Faes P., Niogret M.-f., Deleu C., Berardocco S., Rolland S., Marnet N., Jonard C., Guitton Y., Le Caherec F., Bouchereau A. - Metabolic signatures of rapeseed leaves under nutritional stresses and during ageing. *Workshop on abiotic stress, novembre 2016 à Rennes (35).*

Dechaumet S., Le Caherec F., Leport L., Berardocco S., Rolland S., Marnet N., Jonard C., Guitton Y., Bouchereau A. - Leaf ageing in rapeseed, a qualitative and quantitative metabolomic view. *1ère école printanière du RFMF junior, mai 2017 à Saint Lambert des Bois (78).*

LEAF AGEING IN OILSEED RAPE, A QUALITATIVE AND QUANTITATIVE METABOLOMIC VIEW



Dechaumet S.¹, Le Caherec F.¹, Leport L.¹, Berardocco S.¹, Rolland S.¹, Marnet N.¹, Jonard C.¹, Guitton Y.², Bouchereau A.¹

CONTEXT

Oilseed rape (*Brassica napus* L.) has become the main oilseed crop in Europe mainly grown for edible oil and biofuel, but also for livestock protein feeding. Despite high capacity for mineral nitrogen (N) absorption from soil, organic nitrogen remobilization (NRE) within the plant is considered inefficient, resulting in **low nitrogen use efficiency (NUE ; fig. 1)**. Therefore, oilseed rape production is suffering **significant energetic and environmental penalties**. To meet current challenge of agro-ecology and sustainable agriculture through limitation of N fertilization inputs, these metabolic remobilization processes taking place during sequential **leaf senescence to transfer nutrients from ageing to growing tissues, should be optimized**. However, cellular and metabolic processes associated with leaf senescence remain to be dissected.

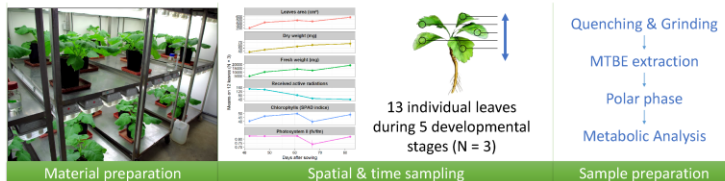


Fig. 1 : Nitrogen needs of main crops (N. in kg/seed quintal).

Our goals are both to elucidate those metabolic processes associated with leaf ageing, and to discover metabolite biomarkers to assist selection towards more efficient oilseed rape genotypes in terms of organic nitrogen recycling and partitioning between tissues.

MATERIAL AND METHODS

First, to assess the sequential evolution of leaf senescence along the main stem axis, leaf development was followed during the vegetative stages of plant growth under optimized conditions by non-destructive physiological measures (image analysis : RGB ; leaf area evolution, chlorophyll content, PSII efficiency : f_v/f_m ; water content). Sampling as been done at 5 developmental stages between 42 and 82 days after sowing. Secondly, primary and secondary metabolism status were acquired by quantitative and qualitative profiling of sampled leaves as follow :



QUANTITATIVE TARGETED METABOLIC PROFILES

Metabolites quantitation of potential effector and regulator of remobilization processes was done by GC-FID (carbohydrates and organic acids after trimethylsilylation), UPLC-DAD (amino acids after AccQ-Tag derivation) and UPLC-TQD (phytohormones).

QUALITATIVE NON-TARGETED METABOLIC PROFILES

Non-targeted metabolomic analysis was performed through UPLC coupled with high resolution mass spectrometry (Orbitrap) from on polar extracts. Results were treated under R (IPO, XCMS and ROPLS).

RESULTS

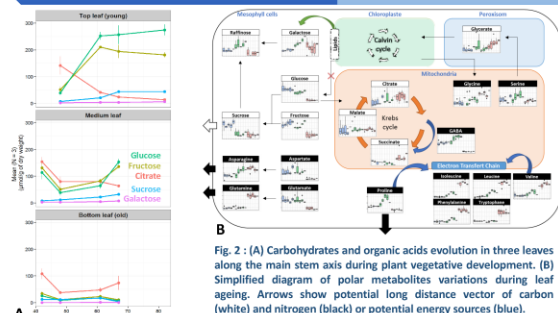


Fig. 2 : (A) Carbohydrates and organic acids evolution in three leaves along the main stem axis during plant vegetative development. (B) Simplified diagram of polar metabolites variations during leaf ageing. Arrows show potential long distance vector of carbon (white) and nitrogen (black) or potential energy sources (blue).

During their development, plant produces carbohydrates as energy storage and building blocks for structural components. These processes result in glucose, fructose and sucrose accumulation (fig. 2A). However, accumulation dynamics are different along the stem axis. The youngest leaves at the top of the plants canopy accumulate very quickly hexoses and sucrose, coming from *in situ* production, or inter-organs remobilization processes. While in the older leaves, hexoses decrease quickly when new (younger) leaves emerge, probably to supply them for their development to finally increase again in intermediate leaves. **Remobilization processes of carbon are closely related to the supply and demand within in the plant organs.** Just before leaves fall (fig. 2B), if almost all polar metabolites are decreasing (glucose, fructose, sucrose, aspartate, glutamate) because of remobilization or catabolic processes, others are increasing significantly (asparagine, glutamine and branched chain amino acids). **These accumulation could be responsible for nitrogen losses and need to be investigated.**

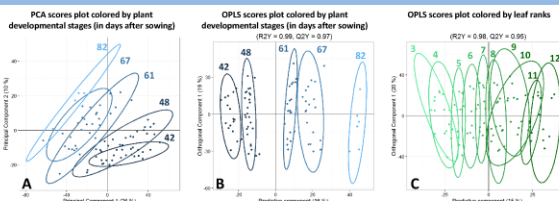


Fig. 3 : Oilseed rape leaves HRMS ions profiles representation using non-discriminant (PCA) (A) and discriminant analysis (OPLS-DA) colored by plant ages (A & B) and leaf rank (C).

Qualitative analyses are under progress. We have detected 2 510 ion groups in at least 30 percent of our 167 leaf samples. As shown by the principal component analysis (fig. 3A), metabolic profiles change gradually during leaf development and also along the stem axis (fig. 3C), suggesting that **metabolic variations are time and space-dependent**. Furthermore, discriminant analysis (fig. 3B & C) were used to subset ions in 3 groups : (1) specific of ageing, (2) specific of leaves rank and (3) commons to both (fig. 4).

From the 2 510 ions detected, 1 468 had a VIP score > 1, and only 20 % were commons to leaves ageing and leaves rank. These preliminary results **show a very strong specificity in metabolites levels involved in ageing or in spatial position of leaves.** However, if selecting potential biomarkers only by an arbitrary value of VIP is sufficient at an early stage of analysis, it's not strong enough to affirm the involvement of these ions. More attention should paid using multiple biomarkers selection tools (LASSO and Random Forest).

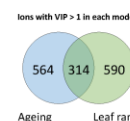


Fig. 4 : Venn diagram of ions with VIP > 1 when ageing or leaf rank is the OPLS response factor.

CONCLUSION

This study clearly shows specific metabolome associated with leaf ageing and/or with spatial position of leaves along the stem axis. Comparative analysis of these quantitative and qualitative results with environmental data gathered during sample preparation will allow us to understand the influence of factors known to promote the onset of senescence (like shading, temperature or humidity) on leaf metabolism.

However, molecular identification of these ions groups remains a priority in order to understand the metabolic pathways affected. Nevertheless, to be used in varietal selection of oilseed rape, their contribution to NRE must be clarified, using environmental and genetic diversity.



This work was supported by



¹ Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes – UMR 1349 – INRA ; Université de Rennes 1 – Agrocampus Ouest – Domaine de la motte – 35650 LE RUEU
² Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA) – Route de Gachet – Site de la Chantrerie – 44307 NANTES

1.3. Communications sous forme d'affiche

Dechaumet S., Le Caherec F., Leport L., Berardocco S., Rolland S., Marnet N., Jonard C., Guitton Y., Bouchereau A. - Leaf ageing in rapeseed, a qualitative and quantitative metabolomic view. *10ème Journées Scientifiques du Réseau Francophone de Métabolomique et de Fluxomique, juin 2016 à Montpellier (34).* *Figure A-I*

Dechaumet S., Albert B., Leport L., Faes P., Niogret M.-f., Deleu C., Berardocco S., Rolland S., Marnet N., Jonard C., Guitton Y., Le Caherec F., Bouchereau A. - Metabolic signatures of oilseed rape source and sink leaves development under nitrogen and/or water limiting conditions. *The third international symposium on the nitrogen nutrition of plants, août 2016 à Montpellier (34).* *Figure A-II*

2. ACTIVITÉS EXTRA-RECHERCHE

2.1. Formations

Octobre 2014 : Ecole chercheur : Spectrométrie de masse et métabolomique (5 jours) à La Colle-sur-Loup (06)

Avril 2015 : Metabolic networks and metabolomics (2 jours) à Toulouse (31)

Octobre 2015 : Formation de Gene Ontology (3 x 1/2 journées) à Rennes (35)

Juin 2016 : Visite du centre de recherche en cosmétologie Helios de LVMH (1 jours) à Saint-Jean-de-Braye (45)

Juin 2016 : Analyse d'images sous Fiji (½ journée) à Rennes (35)

2.2. Ateliers

Juin 2015 : Atelier d'imagerie par spectrométrie de masse (4 heures) à Lille (59)

Mai 2016 : Atelier de fluxomique (3 heures) à Montpellier (34)

2.3. Enseignements

2014 - 2015 : Mission d'enseignements (64 heures) à l'Université de Rennes 1 en Physiologie Végétale.

METABOLIC SIGNATURES OF OILSEED RAPE SOURCE AND SINK LEAVES DEVELOPMENT UNDER NITROGEN AND/OR WATER LIMITING CONDITIONS



Dechaumet S.¹, Albert B.¹, Leport L.¹, Faes P.¹, Niogret M.-F.¹, Deleu C.¹, Berardocco S.¹, Rolland S.¹, Marnet N.¹, Jonard C.¹, Guillon Y.², Le Caherec F.¹, Bouchereau A.¹

CONTEXT

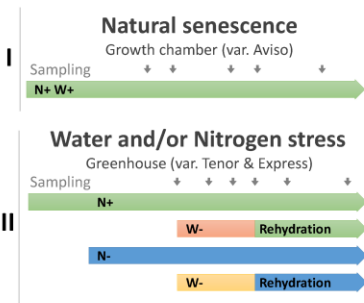
Oilseed rape (*Brassica napus* L.) has become the main oilseed crop in Europe mainly grown for edible oil and biofuel, but also for livestock protein feeding. Despite high capacity for mineral nitrogen (N) absorption from soil, organic nitrogen remobilization (NRE) within the plant is considered inefficient, resulting in **low nitrogen use efficiency** (NUE ; fig. 1). Therefore, oilseed rape production is suffering **significant energetic and environmental penalties**. To meet current challenge of agro-ecology and sustainable agriculture through limitation of N fertilization inputs and limited water accessibility, these metabolic remobilization processes taking place during sequential **leaf senescence to transfer nutrients from ageing to growing tissues, should be optimized**. However, cellular and metabolic processes associated with leaf senescence remain to be dissected.



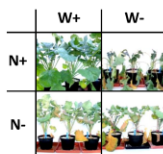
Fig. 1 : Nitrogen needs of main crops (N, in kg/seed quintal).

Our goals are both to elucidate those metabolic processes associated with leaf ageing, and to discover metabolite biomarkers to assist selection towards more efficient oilseed rape genotypes in terms of organic nitrogen recycling and partitioning between tissues.

MATERIAL AND METHODS



Individual leaves sampling across 5 (I) to 6 (II) developmental stages



Metabolic analysis : Metabolomic profiling of polar fractions were done by UPLC-ESI(+/-)-HRMS on (I) to decipher global metabolism variation during natural senescence. For (I) and (II), individual free amino acids and non structural carbohydrates and organic acids were identified and quantified by UPLC-DAD and GC-MS in senescing (source), mature and young (sink) leaves after polar metabolite extraction with a MeOH/HCOOH/H₂O procedure from lyophilized tissues.

Data mining : Metabolomic data integration was done with "IPO" and "xcms" under R and Galaxy environments. Data statistical treatment and representation were done with "ropls" and "ggplot2" packages under R.

RESULTS

Ageing has a strong impact on leaves metabolome with spatial-position specific changes

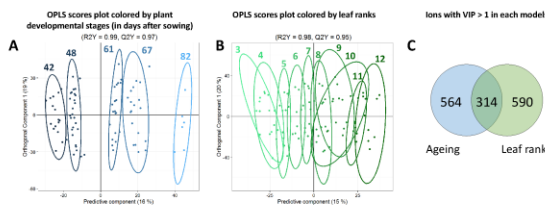


Fig. 2 : Oilseed rape leaves HRMS Ions profiles representation using discriminant analysis (OPLS-DA) colored by plant ages (A) and leaf rank (B) with N = 3. Ions with VIP > 1 in both model are represented in a Venn diagram (C). On 2 510 ions detected, 1 468 had a VIP score higher than 1.

Sink and source leaves have specific amino acids and sugar profiles

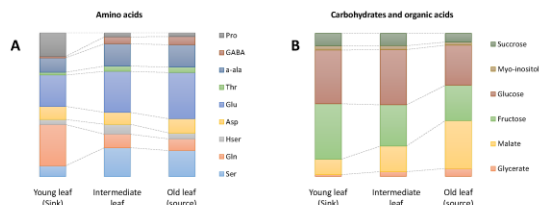


Fig. 3 : Amino acids (A), carbohydrates and organic acids (B) proportions in young, intermediate and old leaves of unstressed plants (N+W+, N = 5) at the first sampling stage.

Metabolic adjustments induced by drought stress strongly depends on nitrogen availability

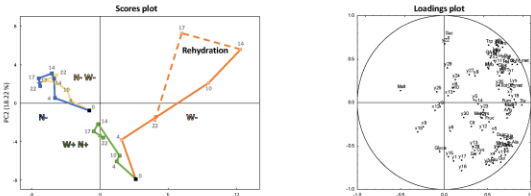


Fig. 4 : Evolution of a leaf metabolic profiles during 22 days, depending on water limitation (orange), Nitrogen limitation (blue) or both (yellow) by multivariate analysis (PCA). Metabolic data sets are made of 87 metabolites (26 amino acids, 6 carbohydrates, 6 organic acids, 49 unknowns).

Major metabolic adjustments occur in leaves with most of them specific to ageing or to spatial position along the stem axis (fig. 2). **During sink to source transition**, amino acids, carbohydrates and organic acids profiles changes (fig. 3) with decreasing proportions of gln, pro, glucose and sucrose, and increasing proportions of glu, ser and malate, certainly due to nitrogen remobilization processes via gln and maybe pro. **When water is limiting** during rapeseed growth, it leads to the accumulation of drought-associated compounds, which can be partially reversed by rehydration (fig. 4). **When nitrogen is limiting**, different metabolites are impacted, with a significant decrease of major amino acids and glucids in leaves implying an active use and/or remobilization of endogenous resources. **Interestingly, when the two deprivations are combined**, drought-associated compounds aren't accumulated and the plant phenotypes and metabolic profiles are very close to the nitrogen stress.

CONCLUSION

This study clearly shows specific metabolome associated with leaf ageing and/or with spatial position of leaves along the stem axis. Comparative analysis of these quantitative and qualitative results with environmental data gathered during sample preparation will allow us to understand the influence of factors known to promote the onset of senescence (like shading, temperature or humidity) on leaf metabolism.

Besides, stressful environmental conditions significantly affect metabolic profiles. Nitrogen depletion leads to a general decrease in N and C free resources in leaves while water deprivation sparks off considerable and diversified accumulation of compounds. Whereas the two combined stress seems to lower the impact of water deprivation.



¹ Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes – UMR 1349 : INRA – Université de Rennes 1 – Agrocampus Ouest, Domaine de la motte – 35650 LE RUEU
² Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Route de Gachet – Site de la Chantrerie – 44307 NANTES

2016 : Encadrement du stage de Roberto MORINO (Master 1 SPV : Université de Rennes 1) : *Etude du devenir métabolique de la proline lors de la sénescence foliaire induite chez le colza par profilage isotopique.*

2016 - 2017 : Mission d'enseignements (64 heures) à l'Université de Rennes 1 en Physiologie Végétale.

2017 : Encadrement du stage de Elise BIZOUERNE (Master 2 BioVIGPA : Université d'Angers) : *Etude spatio-temporelle du devenir de la proline lors de la sénescence foliaire chez le colza.*

2.4. Autres

2015 - 2017 : Gestionnaire de la liste de diffusion des doctorants du département BAP de l'INRA.

2015 - 2017 : Analyses structurales et statistiques des données de métabolomique ciblée et non ciblée du projet QUACHOU (en collaboration avec Gautier Semences, l'Organisation Bretonne de Sélection, Vegenov et la Plateforme de Profilage Métabolique et Métabolomique)

2016 : Organisation de la Journée des Doctorants (JDD) de l'Institut de Génétique, Environnement et Protection de Plantes à Le Rheu (35).

2016 - 2019 : Vice-président de l'association Junior du Réseau Francophone de Métabolomique et de Fluxomique (RFMF). Dans ce cadre, plusieurs actions ont été menées.

- Organisation d'une école printanière pour les jeunes autour des domaines de la métabolomique et de la fluxomique (1ère école du RFMF Junior, du 2 au 5 mai 2017 à la Saint Lambert des Bois).
- Organisation de la première édition du prix de thèse pour récompenser le travail des jeunes docteurs. Implication.
- Organisation d'une journée Junior en marge du congrès de Spectrométrie de Masse, Métabolomique et Fluxomique & Electrophorèse et Analyse Protéomique (SMMAP 2017 à Marne-la-vallée).
- Organisation de l'école automnale 2018 du RFMF Junior à Toulouse
- Organisation d'un atelier Junior en marge des 11ème JS du RFMF à Liège

RÉSUMÉ

Dissection métabolique de la sénescence foliaire et de la remobilisation des nutriments chez le colza (*BRASSICA NAPUS L.*)

Le colza est une culture oléagineuse très exigeante en intrants azotés associée à une faible efficacité d'usage de l'azote (EUA). Le défi majeur vise à améliorer le bilan agroenvironnemental du colza par une optimisation de l'EUA, notamment en condition où l'azote est limitant dans le sol. L'EUA est limitée par une faible efficacité de remobilisation de l'azote (ERA) lors de la sénescence des feuilles. L'objectif de ce travail de thèse a consisté à rechercher, chez le colza, la topologie et l'orientation des attributs métaboliques associées à l'ERA pendant la sénescence foliaire. Les résultats montrent que le métabolome des feuilles évolue tout au long de leur développement végétatif, de leur croissance à leur chute. Il est spécifique à chaque étage foliaire et traduit des relations trophiques et environnementales particulières liées au positionnement des feuilles dans le couvert végétal. Ces spécificités sont associées à des variations de teneurs en glucides, d'acides aminés, de glucosinolates et de coumarines en lien étroit avec la régulation phytohormonale du développement foliaire et avec leur translocation dans le phloème. Le cas de la Proline a été plus particulièrement approfondi et l'activation de son catabolisme sous régulation circadienne dans les tissus sénescents a été mise en évidence. Une approche combinée de transcriptomique et de métabolomique a permis de démontrer une variabilité génotypique importante dans les processus de dégradation et de transport des protéines, glucides et acides aminés entre deux génotypes à forte ERA. De la même manière, des relations fines entre les niveaux d'expression géniques et le contenu métabolique impliqués dans l'augmentation de l'ERA en condition de bas intrants azotés ont pu être décrites.

Les informations recueillies sont discutées au regard des ambitions à améliorer l'efficacité de remobilisation de l'azote et plus généralement des nutriments chez le colza.

Mots-clefs : physiologie végétale, développement foliaire, sénescence, remobilisation, marquage isotopique, métabolomique

ABSTRACT

*Metabolic dissection of leaf senescence and nutrients remobilization in oilseed rape (*Brassica napus L.*)*

Oilseed rape is a very demanding oleaginous crop for nitrogen inputs associated with a low nitrogen use efficiency (NUE). The main challenge to improve the agri-environmental balance of oilseed rape is to optimize the NUE, especially under nitrogen deprivation. The NUE is limited by a low nitrogen remobilization efficiency (NRE) during leaf senescence. The aim of this thesis was to define the metabolome topology and orientation associated with NRE during leaf senescence in oilseed rape.

The results show that leaf metabolome dynamically evolves throughout their vegetative growth, until their fall. Metabolome was found specific to each leaf rank, reflecting the trophic and environmental relationships related to the leaf positioning in the canopy. These specificities are associated with variations in carbohydrates, amino acids, glucosinolates and coumarins contents in close connection with the phytohormonal regulation of leaf development and with their translocation in the phloem. In particular, the activation of Proline circadian-controlled catabolism in senescent tissues was demonstrated. Finally, significant variations in the degradation and transport of proteins, carbohydrates and amino acids between two highly efficient NRE genotypes were highlighted using a combined transcriptomic and metabolomic approach. Similarly, a close relationship has been described between the genes expression levels and the metabolic content involved to increase NRE under low nitrogen input. The results are discussed regarding nitrogen remobilization improvement and more generally nutrients in oilseed rape.

Keywords: Plant physiology, Leaf development, Senescence, Remobilization, Isotopic labelling, Metabolomic



AGROCAMPUS OUEST • Institut nationale supérieur des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
65 rue de Saint-Brieuc – CS84215 – F-35042 Rennes Cedex
Tél. : 02 23 48 50 00
www.agrocampus-ouest.fr

