



**HAL**  
open science

# Etude de l'implication de l'azote dans le débourrement des bourgeons et l'allongement des axes qui en sont issus chez *Rosa hybrida*

Marie-Anne Le Moigne

## ► To cite this version:

Marie-Anne Le Moigne. Etude de l'implication de l'azote dans le débourrement des bourgeons et l'allongement des axes qui en sont issus chez *Rosa hybrida*. Sciences agricoles. Université d'Angers, 2018. Français. NNT : 2018ANGE0012 . tel-02047903v1

**HAL Id: tel-02047903**

**<https://theses.hal.science/tel-02047903v1>**

Submitted on 25 Feb 2019 (v1), last revised 27 Feb 2019 (v2)

**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.

# Thèse de Doctorat

Marie-Anne LE MOIGNE

Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
**grade de Docteur de l'Université d'Angers**  
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

École doctorale : VENAM, Université d'Angers

Discipline : 66/68

Spécialité : physiologie végétale

Unité de recherche : Institut de Recherche en Horticulture et Semences

Soutenue le 03/04/2018

Thèse N° : 118522

## Étude de l'implication de l'azote dans le débourrement des bourgeons et l'allongement des axes qui en sont issus chez *Rosa hybrida*

### JURY

Rapporteurs :	<b>Patricia Roeckel-Drevet</b> , Professeure, équipe FOLEAU de l'UMR PIAF de Clermont-Ferrand <b>Philippe Étienne</b> , Maître de conférences, équipe INCCA de l'UMR EVA de Caen
Examinatrice :	<b>Marie-Fascale Prud'homme</b> , Professeure, équipe Carbone-Défoliation de l'UMR EVA de Caen
Directeur de Thèse :	<b>Alain VIAN</b> , Professeur, équipe Arch-E à l'IRHS, Université d'Angers
Co-encadrants de Thèse :	<b>Jérémy LOTHIER</b> , Maître de conférences, équipe Arch-E à l'IRHS, Université d'Angers <b>Vincent GUÉRIN</b> , Ingénieur de recherche, équipe Arch-E à l'IRHS, Centre INRA des Pays de la Loire



# Thèse de Doctorat

Marie-Anne LE MOIGNE

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université d'Angers  
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : VENAM, Université d'Angers

Discipline : 66/68

Spécialité : physiologie végétale

Unité de recherche : Institut de Recherche en Horticulture et Semences

Soutenue le 03/04/2018

Thèse N° : 118522

## Étude de l'implication de l'azote dans le débourrement des bourgeons et l'allongement des axes qui en sont issus chez *Rosa hybrida*

### JURY

Rapporteurs :	<b>Patricia Roeckel-Drevet</b> , Professeure, équipe FOLEAU de l'UMR PIAF de Clermont-Ferrand <b>Philippe Étienne</b> , Maître de conférences, équipe INCCA de l'UMR EVA de Caen
Examinatrice :	<b>Marie-Fascale Prud'homme</b> , Professeure, équipe Carbone-Défoliation de l'UMR EVA de Caen
Directeur de Thèse :	<b>Alain VIAN</b> , Professeur, équipe Arch-E à l'IRHS, Université d'Angers
Co-encadrants de Thèse :	<b>Jérémy LOTHIER</b> , Maître de conférences, équipe Arch-E à l'IRHS, Université d'Angers <b>Vincent GUÉRIN</b> , Ingénieur de recherche, équipe Arch-E à l'IRHS, Centre INRA des Pays de la Loire



# REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier solennellement l'État français pour avoir financé mon projet de thèse à hauteur d'une bourse ministérielle, ainsi que Jean-Paul Saint André, Président de l'université d'Angers de 2012 à 2016, pour m'avoir attribué cette bourse sur dossier. Merci à tous les membres des équipes administratives de l'Université d'Angers, des écoles doctorales VENAM et EGAAL, et du collège doctoral angevin.

Un grand merci à Jean-Pierre Renou, responsable de l'Institut de Recherche en Horticulture et Semences, ainsi que Soulayman Sakr et Alain Vian, responsables de l'équipe Arch-E, pour m'avoir fait confiance et accueillie au laboratoire au cours de ces trois ans de thèse, mais aussi au cours de mes stages de troisième année de Licence et de première année de Master qui m'avaient déjà fait prendre goût à la recherche fondamentale. Merci à Philippe Simoneau, Élisabeth Chevreau, Marie-Agnès Jacques et Thomas Guillemette, responsables de la SFR QUASAV, avec qui j'ai aimé échanger lors de l'organisation de la Journée Des Doctorants trois années consécutives.

Merci à Patricia Roeckel-Drevet (équipe FOLEAU de l'UMR PIAF de Clermont-Ferrand), Philippe Étienne (équipe INCCA de l'UMR EVA de l'INRA de Caen), et Marie-Pascale Prud'homme (équipe Carbone-Défoliation de l'UMR EVA de l'INRA de Caen), pour avoir accepté d'être membres de mon jury de soutenance et d'évaluer mon travail. Merci également à Annette Morvan-Bertrand (équipe Carbone-Défoliation de l'UMR EVA de l'INRA de Caen), Céline Masclaux-Daubresse (IJPB de l'INRA de Versailles) et Anis Limami (équipe SESaN de l'IRHS) pour votre écoute et vos conseils lors des Comités de Suivi de Thèse.

Je remercie chaleureusement Alain Vian, directeur de thèse, sans qui toute cette aventure n'aurait pas été possible. J'étais venue râler dans votre bureau en troisième année de Licence et je suis ressortie avec un stage sur le thème de l'épigénétique. Le caractère, je l'avais déjà bien trempé, mais vous m'avez appris à maîtriser toute cette énergie pour en tirer profit en créant de la connaissance. Vous avez toujours cru en moi et cela m'a poussé à tenir pour m'en montrer digne. Grâce à votre soutien, j'ai pu donner des cours en Licence pendant chacune de mes trois années de thèse dans le cadre du monitorat, ce qui constitue un acquis solide pour mes expériences futures. Vous m'avez encouragée à devenir responsable des doctorants de l'UFR Sciences, de la Commission Recherche et de la SFR QUASAV pendant trois ans, ce qui m'a donné le temps de comprendre le fonctionnement des institutions et d'agrandir mon réseau. Enfin, merci de m'avoir aidé à préparer mon avenir, présenté des scientifiques extraordinaires et fait découvrir le monde mystérieux du bioélectromagnétisme...

Merci à Jérémy Lothier, qui a été mon co-encadrant pendant ces trois ans de thèse. J'ai appris à tes côtés qu'il n'y a toujours que le résultat qui compte. Tu m'as transmis ta rigueur pour aborder les



interprétations scientifiques et ta capacité à prendre du recul. Merci aussi pour avoir greffé à mon sujet de thèse le projet de RNAseq « TranscriNoeud », qui a été une sacrée opportunité pour moi.

Je remercie Vincent Guérin, qui a été mon co-encadrant pendant cette aventure. Un énorme merci pour les prestations de service que tu as contribué à mener à bien, et qui ont au moins en partie permis de financer mes travaux de thèse. Tu as toujours été très réactif pour m'apporter ton aide et pour que les choses avancent. Merci pour ta sérénité et ta patience à toutes épreuves, ton écoute, ton souci du détail et nos nombreux échanges de bons procédés.

Un merci amical à Anita Lebec, technicienne de l'équipe Arch-E, qui s'est impliquée dans la culture *in vitro*, les micropesées et les dosages de sucres réalisés au cours de cette thèse. Ces trois années, faites de hauts et de bas, nous ont beaucoup rapprochées. J'espère que l'avenir nous permettra de travailler ensemble à nouveau !

Merci à tous les membres de l'équipe Arch-E pour m'avoir donné des conseils scientifiques, techniques, stratégiques et humains. Merci notamment à Soulayman Sakr, Ming Wang, Laurent Crespel, Vincent Billard, Camille Li-Marchetti et Hanaé Roman pour nos discussions scientifiques enrichissantes. Merci aux membres de l'équipe ImHorPhen pour avoir bichonné les milliers de rosiers que je vous ai commandés en deux ans et demi. Une pensée émue pour Muriel Bahut (co-responsable du plateau technique ANAN), Sandra Pelletier (équipe BioInfo) et Laurence Hibrand-Saint Oyant (équipe GDO), qui m'ont techniquement et moralement soutenue pour mener à son terme le projet TranscriNoeud. Merci à Caroline Cukier (équipe SESaN) pour son aide pour les dosages d'acides aminés dans la sève et ses conseils pour interpréter les résultats de marquage au  $^{15}\text{N}$ . Merci à Nathalie Marnet et à Alain Bouchereau pour m'avoir accueillie deux semaines sur la plateforme P2M2 du Rheu. Merci aux membres de l'UMR EVA de Caen pour m'avoir permis de réaliser deux jours de manipulation dans leurs locaux pendant le déménagement des laboratoires angevins. Merci à Étienne Bucher et à toute l'équipe EpiCenter de l'IRHS pour m'avoir accueillie au club d'épigénétique pendant quelques mois en deuxième année de thèse. Un grand merci à tous les membres des fameuses équipes du R+1 (QuaRVeg et GDO) pour leur soutien moral pendant les pauses café.

Un merci chaleureux à Thomas Guillemette et Pascal Poupard pour m'avoir fait confiance en cette fin de thèse en me recrutant en tant qu'ATER dans l'équipe FungiSem de l'IRHS. Un grand merci à Romain Berruyer et Julia Courtial pour leur aide pour les analyses statistiques des q-PCR.

Une bise à mes différents colocataires de bureau pendant ces trois ans : Hanaé Roman, Adrien Corot (équipe Arch-E), Mathilde Liorzou et Kévin Debray (équipe GDO). Merci à Hanaé pour m'avoir initiée à la vie du laboratoire et à la rigoureuse gestion des échantillons pendant ma première année de thèse dans notre mythique couloir du bâtiment A à la FAC. Spéciale dédicace ensuite à



Kévin Debray, qui a partagé le dur quotidien de ma vie de doctorante de troisième année de thèse. Merci pour ton soutien, nos échanges sur Game of Thrones, tes bonbecs et tes cours de néerlandais. Je souhaite également beaucoup de réussite à Alexis Porcher, le doctorant qui me succède dans l'équipe Arch-E. Surtout, n'oublie pas de faire des choses que tu aimes ! Une bise également à Claire Yovanopoulos, Mathilde Piquet (équipe QuaRVeg) et Nancy Wilmot (équipe Arch-E), qui m'ont chacune leur tour apporté leur soutien et dont le départ a été douloureux. Merci également à Mathilde Goulu (RCIM), Vincent Goyet (LBPV, Nantes) et Claude Koutouan (équipe QuaRVeg) qui ont été représentants des doctorants de la SFR QUASAV à mes côtés. Merci aux « copines doctorantes du R+2 », Julia Courtial, Elodie Belmas (équipe Fungisem) et Élise Réthoré (équipe MitoStress), avec qui il a toujours été un plaisir de travailler et d'échanger sur nos galères respectives. Un merci ému aux différents stagiaires que j'ai co-encadré dans le cadre de ma thèse : Laura Flores, Félix Delcourt, Marion Couapel et Adrien Jallais. Je vous souhaite beaucoup de courage pour la fin de vos études. J'ai déjà hâte de vous croiser en tant que collègues.

Une énorme bise à tous mes proches, malgré les kilomètres qui nous ont séparés de si nombreuses fois. Merci pour m'avoir fait confiance les yeux fermés, même lorsque tout vous paraissait si complexe, abstrait et lointain. Merci à mes parents, Paul et Chantal, pour m'avoir inculqué certaines valeurs qui se sont révélées être des sources de réussite pendant cette thèse. Grandir dans notre écriin de verdure breton ne pouvait que me conditionner à aimer les plantes. Merci à mon premier frère Aurélien et à Carole pour nous avoir offert deux beaux bébés pendant ma thèse, Soline et Matiss, sans oublier leur grand frère Naël. Merci à mon deuxième frère Alexandre et à Laura pour ces quelques soirées de déconnexion totale au fin fond de la campagne bigoudène. Des gros bisous de scientifique à mes neveux Roman et Lyse, que j'ai initiés à la biologie végétale. Une pensée particulière pour ma marraine Françoise Lagadic, qui a largement contribué au bon déroulement de mes études en mettant à disposition sa maison rennaise pendant mon M2 et lors de mon passage à la plateforme P2M2 du Rheu pendant ma thèse. Je voulais faire également une spéciale dédicace à mon « grand-petit frère » Hervé Kervarec, dont le lourd handicap mental m'a questionnée quotidiennement pendant ma jeunesse et m'a poussée instinctivement vers la recherche fondamentale.

Steve, l'homme de l'ombre. Tu sais qu'aucun de nous ne souhaite tomber dans le cliché du paragraphe « culcul » de remerciements à celui sans qui tout ça n'aurait pas eu de sens. Pour me la jouer brève, pour une fois, merci d'avoir accepté de tout subir.

Merci enfin à toutes les femmes fortes qui m'ont soutenue, malheureusement à distance, pendant ces trois années passées le nez dans les bouquins. Une pensée émue pour Cécile Gulczinski et Chloé Camus, les belettes de l'IUT, ainsi que Catherine Hubert, Fatima Aissa Abdi et Katia Gharib, avec qui j'ai partagé des moments intenses pendant nos trois mois de M2 à Rennes.



*« Je cultiverai toujours mes plantes de langage »*

*François Morel, au lendemain de l'attaque contre Charlie Hebdo (07/01/2015).*



# LISTE DES ABRÉVIATIONS

6-BAP : 6-benzylaminopurine ou benzyladénine  
 $^{13}\text{C}$  : isotope stable du carbone  
 $^{15}\text{N}$  : isotope stable de l'azote  
 $\mu\text{g}$  : microgramme  
 $\mu\text{L}$  : microlitre  
 $\mu\text{M}$  : micromolaire  
 $\mu\text{mol}$  : micromole  
 $\mu\text{g}$  : microgramme  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ADNc : ADN complémentaire  
AIA : Acide Indole-3-Acétique  
Ala : alanine  
Arg : arginine  
ARN : acide ribonucléique  
Asn : asparagine  
ASNS, AS, ASN : asparagine synthétase  
Asp : aspartate  
ASNase : asparaginase  
Axe I : axe primaire (tige issue du débourrement du bourgeon de la bouture)  
Axe II : axe secondaire  
BFV : bouton floral visible  
BRC1 : BRANCHED1  
BSP : Bark Storage Protein, protéine de réserve de l'écorce  
CK : cytokinine  
 $\text{CO}_2$  : dioxyde de carbone  
CPV : couleur pétales visible  
Cys : cystéine  
dNTP : desoxyribonucléique  
DTT : dithiotreitol  
EDTA : acide éthylène diamine tetra acétique  
FAD : flavine adénine dinucléotide  
GAD : glutamate décarboxylase  
GABA : acide  $\gamma$ -aminobutyrique  
Gln : glutamine  
GS2 : glutamine synthétase  
Glu : glutamate  
Gly : glycine  
HXK : hexokinase  
His : histidine  
IPT : adénosine phosphate isopentenyltransférase  
Ile : isoleucine  
 $\text{KNO}_3$  : nitrate de potassium  
LDOX : leucoanthocyanidin dioxygénase ou anthocyanidin synthase  
Leu : leucine  
Lys : lysine  
MAC : méristème apical caulinaire  
MAX : more axillary growth



Met : méthionine  
MF : matière fraîche  
mg : milligramme  
min : minute  
mL : millilitre  
mm : millimètre  
mM : milli molaire  
MS : matière sèche  
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide  
NADH : forme réduite du NAD  
NO : monoxyde d'azote  
NO<sub>2</sub> : nitrites  
NR : Nitrate réductase  
NAA : 1-Naphthaleneacetic acid, auxine de synthèse  
NRA : nitrate reductase activity, activité de la nitrate réductase  
NRT: nitrate transporter  
PATS : polar auxin transport stream, flux polarisé du transport de l'auxine  
PAR : photosynthetically active radiation, rayonnement photosynthétique actif  
PCR : polymerase chain reaction  
Phe : phénylalanine  
PIN : PIN-FORMED carrier proteins  
PIP : plasma membrane intrinsic protein  
Pro : proline  
PVP40 : polyvinylpyrrolidone 40  
QSP : « quantité suffisante pour »  
Rh : *Rosa hybrida*  
RNAseq : RNA sequencing, séquençage des transcrits à haut débit  
RT : reverse transcription, transcription inverse  
RSA : allocation spécifique relative (azote nouvellement absorbé)  
Ser : serine  
SNP : sodium nitroprusside  
SUC/SUT : sucrose carrier / transporter  
SWEET : transporteur d'hexose et de saccharose  
TAE : tris-acétate-EDTA  
TCP : Teosinte branched1, Cycloidia, and Proliferating cell factor  
Thr : thréonine  
Trp : tryptophane  
Tyr : tyrosine  
VI : vacuolar invertase, invertase vacuolaire  
VSP : vegetative storage proteins, protéines végétatives de réserve.



# LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX

## Liste des tableaux :

- Tableau 1 : comparaison de la composition des milieux utilisés en culture *in vitro*.
- Tableau 2 : séquences des amorces des gènes sélectionnés par l'approche RNAseq.
- Tableau 3 : séquences des amorces des gènes impliqués dans le débourrement.

## Liste des figures :

- Figure 1 : architecture du rosier buisson *Rosa hybrida*.
- Figure 2 : fonctionnement du bourgeon.
- Figure 3 : représentation des signaux et des saisons typiques correspondant aux différents types de dormance et aux saisons associées, définis par Lang *et al.* (1987).
- Figure 4 : aspect des bourgeons.
- Figure 5 : voies de synthèse et de transport de l'auxine (IAA, acide indole-3-acétique).
- Figure 6 : modèles de régulation du débourrement des bourgeons axillaires soumis à la dominance apicale.
- Figure 7 : modèle des voies de biosynthèse et de dégradation des différentes formes des cytokinines.
- Figure 8 : Modèle de la perception des cytokinines à l'échelle d'une cellule.
- Figure 9 : principaux acteurs de la voie de synthèse et de signalisation des strigolactones.
- Figure 10 : schéma hypothétique de la signalisation par le nitrate.
- Figure 11 : voie de biosynthèse de l'asparagine.
- Figure 12 : principales voies d'assimilation de l'asparagine d'après Gaufichon *et al.* (2010).
- Figure 13 : principales voies de dégradation de l'asparagine d'après Hildebrandt *et al.* (2015).
- Figure 14 : localisation des transporteurs d'acides aminés chez les plantes.
- Figure 15 : métabolisme et effets signalétiques du saccharose
- Figure 16 : intégration des rôles des sucres dans le débourrement.
- Figure 17 : étapes de production des boutures de *Rosa hybrida*.
- Figure 18 : pathogènes de *Rosa hybrida* présents en serre.
- Figure 19 : culture des rosiers au laboratoire en conditions contrôlées.
- Figure 20 : morphologie du modèle expérimental (*Rosa hybrida*).
- Figure 21 : itinéraires de culture utilisés pour les expériences menées dans le cadre de ce travail.
- Figure 22 : caisson pour culture *in vitro* d'explants de rosier en lumière blanche.
- Figure 23 : illustration des deux configurations d'explants utilisés en culture *in vitro*.
- Figure 24 : sites de collecte de sève.
- Figure 25 : préparation des banques d'ADNc.
- Figure 26 : élongation, biomasse sèche et teneur en azote des axes II en fonction de leur position sur l'axe I en réponse au traitement N12.
- Figure 27 : phénotypes de *Rosa hybrida* obtenus 7 jours après la décapitation (J+7) en réponse à différents traitements azotés indiqués au-dessus des photos.
- Figure 28 : élongation des axes II en fonction de leur position le long de l'axe I dans différentes conditions de nutrition en nitrate après décapitation.
- Figure 29 : biomasses fraîches et sèches dans différentes conditions de culture.
- Figure 30 : effets du nitrate sur la date de floraison.



- Figure 31 : effet d'apport de tungstate (N12+W) à J+0 sur le phénotype, l'élongation des axes II et la biomasse fraîche produite à J+14 en présence de 12 mM de nitrate.
- Figure 32 : concentrations en acides aminés, en nitrate et en ammonium de la sève prélevée au-dessous du phytomère le plus basal sur l'axe I.
- Figure 33 : flux d'acides aminés dans la sève à J+0, J+1 et J+4 chez *Rosa hybrida* en présence de 12 mM de nitrate.
- Figure 34 : concentrations des différentes formes de transport de l'azote dans la sève le jour de la décapitation (J+0) et sept jours après (J+7).
- Figure 35 : concentrations des acides aminés dans la sève le long de l'axe I à J+14 chez les plantes sous traitement N6N0N6.
- Figure 36 : teneurs en nitrate et en acides aminés dans différents organes chez *Rosa hybrida* en présence de 12mM de nitrate (traitement N12).
- Figure 37 : teneurs en acides aminés dans les différents organes (apex, feuilles, tige, racines et axes II) chez *Rosa hybrida*.
- Figure 38 : effet du nitrate sur les teneurs en asparagine, glutamine et aspartate au sommet et à la base de la tige.
- Figure 39 : effet du nitrate sur les teneurs en acides aminés et ammonium à J+7 dans les axes II du sommet (3/4) et de la base (1/2) le long de l'axe I.
- Figure 40 : teneurs en différents sucres dans les organes (apex, feuilles, tige, racines et axes II) en présence de 12 mM de nitrate.
- Figure 41 : effet du nitrate sur les teneurs en différents sucres dans les organes (apex, feuilles, tige, racines et axes II).
- Figure 42 : effet du nitrate sur les teneurs en sucres au sommet et à la base de la tige.
- Figure 43 : effet du nitrate sur l'activité photosynthétique des feuilles de la base et du sommet de l'axe I.
- Figure 44 : effet du saccharose sur l'allongement des bourgeons médians cultivés *in vitro* sur un milieu de base complétement par différentes sources d'azote (10 mM).
- Figure 45 : effet de différentes sources d'azote (10 mM ; nitrate, ammonium et acides aminés) sur les phénotypes des bourgeons et jeunes axes II à J+7 cultivés *in vitro* sur un milieu de base en présence ou en l'absence de saccharose (100 mM).
- Figure 46 : effet de différentes sources d'azote (10 mM, nitrate ou asparagine) et de sucres (100 mM de saccharose, fructose ou glucose) sur les phénotypes des bourgeons à J+7 et jeunes axes II à J+7 cultivés *in vitro* sur un milieu de base.
- Figure 47 : importance de la chiralité sur la forme biologiquement active de l'asparagine.
- Figure 48 : effet de différentes sources d'azote à différentes concentrations sur l'allongement des bourgeons médians cultivés *in vitro* sur un milieu de base.
- Figure 49 : effet du nitrate ou de l'asparagine sur le phénotype à J+7 des bourgeons ou des jeunes axes II cultivés *in vitro*.
- Figure 50 : effet de la glutamine et de l'aspartate sur le phénotype à J+7 des bourgeons ou des jeunes axes II cultivés *in vitro*.
- Figure 51 : effet de diverses sources d'azote aux concentrations physiologiques sur l'allongement des axes II en présence de différentes concentrations de saccharose.
- Figure 52 : phénotypes des bourgeons ou jeunes axes II cultivés *in vitro* sur un milieu de base additionné de différentes sources d'azote aux concentrations physiologiques.
- Figure 53 : variation d'expression des acteurs de la voie de biosynthèse de l'asparagine isolés par l'approche RNAseq.
- Figure 54 : effet du nitrate (en présence de saccharose) sur l'abondance relative des transcrits dans les nœuds (tige et bourgeon).
- Figure 55 : métabolisme de l'asparagine.



- Figure 56 : teneurs en acides aminés dans la tige et le bourgeon à J+1 *in vitro*.
- Figure 57 : origine d'un des atomes d'azote (enrichissement en <sup>15</sup>N) des acides aminés prédominants dans la tige et le bourgeon à J+1 *in vitro*.
- Figure 58 : effet de la taille du fragment de tige sur la biomasse fraîche produite en culture *in vitro* dans les axes II.
- Figure 59 : origine de l'azote dans les axes II et dans les molécules azotées majoritaires.
- Figure 60 : effet des apports en nitrate sur l'origine d'un des atomes d'azote dans les axes II le long de l'axe I à J+7.
- Figure 61 : effet de la mise en culture *in vitro* des nœuds sur l'abondance relative des transcrits des gènes d'intérêt à J+1 en réponse au milieu de base.
- Figure 62 : effet d'une auxine de synthèse sur l'allongement et le phénotype des bourgeons et jeunes axes II à J+7.
- Figure 63 : métabolisme de l'auxine.
- Figure 64 : accumulation des transcrits des facteurs de transcription.
- Figure 65 : effet de l'apport d'azote et de cytokinine de synthèse sur l'allongement des axes II cultivés *in vitro*.
- Figure 66 : phénotype des bourgeons en présence de BAP dans différentes conditions d'apport d'azote.
- Figure 67 : métabolisme des cytokinines.
- Figure 68 : accumulation des transcrits du gène *MAX2* dans la tige et le bourgeon.
- Figure 69 : effet de la lumière et de la source d'azote sur l'allongement des axes II *in vitro* et le phénotype des bourgeons.
- Figure 70 : typologie des séquences exprimées ou réprimées à J+1 en réponse au nitrate dans les nœuds cultivés *in vitro*.
- Figure 71 : part relative des différents aspects du métabolisme primaire de l'azote identifiés par l'approche RNAseq.
- Figure 72 : accumulation des transcrits des gènes *RhSUC2* et *RhIVI* (métabolisme des sucres) dans la tige et le bourgeon.
- Figure 73 : variation d'expression des acteurs de la voie de biosynthèse des composés phénoliques identifiés par l'approche RNAseq.
- Figure 74 : variation d'expression des acteurs du métabolisme du glutamate et de la proline identifiés par l'approche RNAseq.
- Figure 75 : variation d'expression des acteurs du métabolisme de la méthionine identifiés par l'approche RNAseq.
- Figure 76 : effet de la position initiale du bourgeon sur la cinétique d'allongement des axes II et phénotypes associés à J+7.
- Figure 77 : effet du saccharose sur le niveau de méthylation global du génome des bourgeons.
- Figure 78 : variation d'expression des acteurs du métabolisme de la cystéine identifiés par l'approche RNAseq.
- Figure 79 : répartition des métabolites le long de l'axe I à J+0.
- Figure 80 : modèle hypothétique des rôles de l'asparagine et des sucres au cours du débourrement et la nutrition des axes II, dans la voie de l'auxine, des cytokinines et des strigolactones chez *Rosa hybrida*.



# SOMMAIRE

<b>CADRE STRUCTUREL .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>4</b>
<b>I° Contexte de l'étude .....</b>	<b>5</b>
1- Enjeux économiques.....	5
2- Histoire et phylogénie .....	6
3- Architecture de la plante modèle.....	7
<b>II° Le débourrement des bourgeons .....</b>	<b>9</b>
1- Fonctionnement du bourgeon .....	9
2- Les régulateurs de croissance impliqués dans la dominance apicale.....	11
<b>III° Régulation du débourrement et de l'allongement des axes II par l'azote.....</b>	<b>12</b>
1- Effet de la disponibilité en azote sur l'architecture des plantes .....	12
2- Métabolisme de l'azote.....	13
3- Origines de l'azote qui alimente les axes II en croissance .....	18
4- Effets de l'azote sur le statut des régulateurs de croissance .....	21
<b>IV° Régulation du débourrement et de l'allongement des axes II par les sucres .....</b>	<b>26</b>
1-Le métabolisme des sucres .....	26
2- La signalisation par les sucres au cours du débourrement.....	28
<b>V° Implication d'une composante épigénétique dans le débourrement .....</b>	<b>30</b>
<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>35</b>
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>36</b>
<b>I° Culture en serre et maintien de l'état phytosanitaire du matériel végétal.....</b>	<b>37</b>
<b>II° Culture de plantes en conditions contrôlées .....</b>	<b>37</b>
1- Culture en présence d'une forte concentration de nitrate .....	38
2- Culture en conditions limitantes en nitrate .....	38
<b>III° Culture <i>in vitro</i> de bourgeons.....</b>	<b>39</b>
1- Culture <i>in vitro</i> de bourgeons de la base et du sommet de l'axe I sur un milieu MS(+N) classique .....	39
3- Culture <i>in vitro</i> de bourgeons médians maintenus sur un fragment de tige de taille variable .....	40
4- Culture <i>in vitro</i> de bourgeons médians en présence de différentes sources d'azote .....	40
5- Culture <i>in vitro</i> de bourgeons à l'obscurité .....	41
6- Culture <i>in vitro</i> de bourgeons en présence des régulateurs de croissance .....	41
<b>IV° Détermination de l'origine de l'azote retrouvé dans les axes en allongement .....</b>	<b>42</b>
<b>V° Mesure de l'activité photosynthétique .....</b>	<b>43</b>



<b>VI° Mesures de la composition de la sève .....</b>	<b>44</b>
1- Dosages des acides aminés par GC-MS .....	44
2- Dosage des acides aminés totaux par la méthode de Rosen .....	44
3- Détermination du flux d'acides aminés dans la sève .....	45
4- Dosage du nitrate dans la sève.....	45
<b>VII° Dosage des acides aminés dans les tissus .....</b>	<b>46</b>
<b>VIII° Dosage des sucres dans les tissus.....</b>	<b>46</b>
<b>IX° Dosages des régulateurs de croissance dans les tissus de tige cultivés <i>in vitro</i> .....</b>	<b>46</b>
<b>X° Analyses épigénétiques .....</b>	<b>47</b>
1- Extraction de l'ADN des bourgeons.....	47
2- Détermination du taux global de méthylation du génome .....	47
<b>XI° Analyse des accumulations de transcrits de gènes sélectionnés avec et sans <i>a priori</i> .....</b>	<b>47</b>
1- Séquençage des transcrits à haut débit (RNA sequencing).....	47
2- Validation des données de RNAseq par q-PCR .....	49
3- Quantification de l'expression des gènes impliqués dans le débourrement par q-PCR.....	50
<b>XII° Analyses statistiques des résultats .....</b>	<b>50</b>
<b>XIII° Analyses statistiques relatives aux q-PCR .....</b>	<b>51</b>
<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>53</b>
<b>I° Phénotypage .....</b>	<b>54</b>
1- Architecture des rosiers en réponse à la disponibilité du nitrate .....	54
2- La floraison en réponse à la disponibilité du nitrate .....	55
3- Effet du tungstate sur l'architecture des rosiers.....	56
<b>II° Évolution de la composition de la sève au cours du débourrement .....</b>	<b>56</b>
1- Composition de la sève au cours du débourrement en condition standard .....	56
2- Évolution du flux d'acides aminés dans la sève au cours du débourrement .....	57
3- Composition de la sève en réponse à la disponibilité du nitrate au cours du débourrement .....	57
4- Composition de la sève le long de l'axe I.....	58
<b>III° Évolution de la composition en azote des tissus au cours du débourrement.....</b>	<b>58</b>
1- Teneurs en nitrate et en acides aminés chez les plantes non-carencées .....	58
2- Teneurs en acides aminés en fonction de la disponibilité du nitrate.....	59
3- Évolution de la teneur en acides aminés dans la tige le long de l'axe I.....	59
4- Teneurs en acides aminés dans les axes II le long de l'axe I en fonction de la disponibilité en nitrate.....	60
<b>IV° Évolution du métabolisme des sucres au cours du débourrement .....</b>	<b>60</b>
1- Teneurs en sucres dans les tissus .....	60
c- Évolution des teneurs en sucres dans la tige le long de l'axe I.....	61
2- Photosynthèse en réponse à la décapitation et la disponibilité du nitrate .....	62



<b>V° Implication de l'azote et des sucres dans le débourrement .....</b>	<b>62</b>
1- Culture <i>in vitro</i> de nœuds en présence de sucre et de différentes sources d'azote .....	62
2- Étude du transcriptome des bourgeons .....	65
<b>VI° Origine de l'azote dans les axes II au cours du débourrement .....</b>	<b>66</b>
1-Origines de l'asparagine dans les axes II <i>in vitro</i> .....	66
2- Origines de l'asparagine à J+4 et J+7 <i>in planta</i> .....	67
3- Effets de la disponibilité en nitrate et de la position sur l'axe I sur l'origine de l'azote.....	68
<b>VII° Effets de l'asparagine sur le statut des régulateurs de croissance au cours du débourrement.....</b>	<b>69</b>
1- Mise en culture des tissus et levée de dominance apicale .....	69
2- Liens entre l'asparagine, le saccharose et l'auxine.....	70
2- Liens entre l'asparagine, le saccharose et les facteurs de transcription .....	71
3- Liens entre l'asparagine, le saccharose et les cytokinines .....	72
<b>VIII° Liens entre la lumière et l'asparagine .....</b>	<b>74</b>
<b>IX° Évolution du transcriptome des nœuds au cours du débourrement.....</b>	<b>75</b>
1- Catégories de gènes dont la pertinence a été étudiée par des expériences ou corrélée à d'autres résultats ..	77
2- Catégories de gènes dont l'implication est associée à des données bibliographiques .....	82
 <b>DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>	 <b>87</b>
<b>I° La disponibilité en nitrate a des effets sur l'architecture et la floraison .....</b>	<b>88</b>
1- Nombre de ramifications produites et allongement.....	88
2- Induction de la floraison.....	89
3- Effets des produits d'assimilation du nitrate sur l'architecture .....	89
<b>II° Effets de la décapitation et la disponibilité en nitrate sur le métabolisme de la plante.....</b>	<b>90</b>
1- Évolution de la composition de la sève au cours du débourrement .....	90
2- Métabolisme des acides aminés dans les différents organes .....	93
3- Photosynthèse et le métabolisme des sucres.....	95
<b>III° La présence simultanée d'asparagine et d'un sucre est nécessaire à l'allongement des axes II cultivés <i>in vitro</i>.....</b>	<b>98</b>
1- L'asparagine est le principal acide aminé impliqué dans l'alimentation en azote des axes II.....	98
2- L'allongement des axes II est possible à l'obscurité en présence d'asparagine et de sucre .....	103
3- Les gènes du métabolisme de l'asparagine sont exprimés à J+1 dans les nœuds.....	104
<b>IV° L'origine de l'asparagine varie au cours de l'allongement des axes II.....</b>	<b>111</b>
1- Importance du métabolisme des protéines.....	111
2- Origines de l'asparagine à J+1 .....	112
3- Origines de l'azote à J+4 et J+7 .....	113
4- Liens entre la mobilisation des réserves, les régulateurs de croissance et l'asparagine.....	114
<b>V° Évolution du statut des régulateurs de croissance dans les différents contextes nutritionnels .....</b>	<b>115</b>
1- Évènements moléculaires survenant en réponse à la baisse du niveau d'auxine et à la mise en culture ....	115
2- Évènements moléculaires dans la condition permissive.....	116



3- Évènements moléculaires en présence de saccharose.....	120
4- Évènements moléculaires en présence d'asparagine .....	121
5- Modalités des effets du saccharose et de l'asparagine.....	123
6- Implication d'une composante épigénétique dans le débourrement .....	124
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>128</b>
<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>133</b>
<b>I° Perspective principale : étudier le devenir de l'asparagine au cours de l'allongement des axes II .....</b>	<b>134</b>
<b>II° Seconde perspective : déterminer si des évènements de signalisation surviennent en réponse à l'azote au cours du débourrement.....</b>	<b>136</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>139</b>
<b>ANNEXES des résultats de RNAseq .....</b>	<b>176</b>
<b>ANNEXES des résultats de dosages des acides aminés dans les tissus .....</b>	<b>203</b>
<b>ANNEXES des résultats de q-PCR.....</b>	<b>216</b>
<b>VALORISATIONS SCIENTIFIQUES .....</b>	<b>222</b>



# CADRE STRUCTUREL



Ces travaux ont été menés à l'Institut de Recherche en Horticulture et Semences (IRHS) qui est une unité mixte de recherche établie entre l'université d'Angers, l'INRA et l'école d'ingénieurs AgroCampus-Ouest, au sein de l'équipe Architecture et Environnement (Arch-E) qui est intégrée au pôle « Architecture et Floraison sur Rosiers et Autres Ornementales ».

La trentaine de membres de cette équipe étudie les effets des facteurs environnementaux sur le débourrement des bourgeons chez le rosier buisson et leurs conséquences sur la mise en place de l'architecture. L'équipe Arch-E est une équipe d'écophysiologistes travaillant aux différentes échelles d'organisation du vivant : de l'état épigénétique de gènes clés à l'échelle de la plante entière. Cela entraîne l'utilisation de modèles variés :

- Le bourgeon peut être isolé du contexte de la tige (axe I) et cultivé *in vitro* dans différentes conditions qui nous permettent d'interpréter son comportement d'un point de vue moléculaire, notamment au travers de l'étude du rôle des régulateurs de croissance et du suivi détaillé du niveau d'accumulation des transcrits de certains gènes clés.

- Une fois qu'un phénomène a été mis en évidence *in vitro*, il s'agit de l'intégrer le long de l'axe I à l'échelle de la plante. Comme la présence de l'apex induit la dominance apicale, les plantes sont décapitées en début d'expérience pour homogénéiser leur débourrement. La zone de la décapitation peut varier le long de l'axe, selon la question biologique associée à l'expérience, pour introduire dans la compréhension du mécanisme les corrélations entre organes qui prennent place le long de l'axe I. Des modèles simplifiés (plantes défeuillée, fragments d'axes) sont également utilisés. Mes travaux ont été menés à ces deux premières échelles.

- À l'échelle de la plante entière, certains membres de l'équipe Arch-E redonnent sa juste place à l'influence qu'exerce le bouton floral sur le métabolisme global de la plante au cours de la floraison et du débourrement des bourgeons. Les études portent généralement sur des modèles plus âgés que les précédents, de quelques semaines à plusieurs mois. À cette échelle, il a été également mis en place, par numérisation 3D de rosiers (Garbez *et al.*, 2015, 2016), une méthode objective de définition de la qualité visuelle de différents phénotypes obtenus en fonction de variations environnementales.

- Une partie des membres de l'équipe Arch-E travaille à l'intégration des différents résultats dans un modèle structure-fonction qui pourrait, à terme, rendre-compte et prédire le développement architectural des rosiers en réponses à des contraintes environnementales.



- Enfin, l'analyse de l'équipe Arch-E se prolonge jusqu'à l'écoute des avis et des besoins des consommateurs pour déceler les futures tendances d'achat, notamment dans les environnements urbanisés, par une participation active à l'UMT Stratège mise en place à Angers en 2017.

L'architecture et la qualité visuelle d'une plante sont conditionnées par les interactions entre le patrimoine génétique et les conditions de culture (Li-Marchetti *et al.*, 2015b). De nombreux facteurs de l'environnement contribuant au débourrement ont été étudiés dans l'équipe Arch-E. Les bourgeons de rosier ont un besoin absolu de lumière pour débourrer (Girault *et al.*, 2008). La **quantité et la qualité de la lumière** sont importantes (la lumière blanche, le rouge clair et le bleu stimulent le débourrement, alors que le rouge sombre l'inhibe) et ont fait l'objet de plusieurs revues dans l'équipe (Leduc *et al.*, 2014; Demotes-Mainard *et al.*, 2015; Huché-Thélier *et al.*, 2016). La **disponibilité en eau**, impliquée dans la circulation de la sève et le maintien de la pression osmotique des cellules des tissus en croissance, est également essentielle dans la mise en place de l'architecture (Demotes-Mainard *et al.*, 2013; Li-Marchetti *et al.*, 2015). Les effets de différents **apports de nitrate** dans la solution nutritive ont également été abordés chez le rosier, en lien avec la quantité de lumière, mais sans établir la nature des molécules impliqués dans l'alimentation des axes II (Huché-Thélier *et al.*, 2011; Furet *et al.*, 2013). La capacité d'absorption de l'eau et des éléments nutritifs au niveau racinaire est conditionnée par la **température** du sol, comme il a été montré chez le pommier (Dong *et al.*, 2001). La répétition de *stimuli* mécaniques (**thigmomorphogénèse**) est également connue pour stimuler la ramification chez le rosier (Morel *et al.*, 2012).

Pour s'adapter aux contraintes de leur environnement, les plantes déclenchent des événements de signalisation qui ont des conséquences sur le métabolisme des acteurs endogènes tels que les **régulateurs de croissance** (auxine, cytokinines, strigolactones, acide abscissique, gibbérellines, *etc.*, Choubane *et al.*, 2012; Djennane *et al.*, 2014; Rabot *et al.*, 2014; Azri *et al.*, 2015; Roman *et al.*, 2016), les **sucres** (saccharose, glucose, fructose, sorbitol, tréhalose, *etc.*, Girault *et al.*, 2010; Henry *et al.*, 2011; Rabot *et al.*, 2012; Barbier *et al.*, 2015a,b) et l'**azote** (Furet *et al.*, 2013). En revanche, **l'identité et l'origine des molécules issues de la réduction du nitrate qui sont impliquées dans l'alimentation en azote des axes II restent à déterminer. Nous avons axé l'ensemble de notre étude sur la mise en évidence d'événements de nutrition après la levée de dominance apicale.**



INTRODUCTION  
BIBLIOGRAPHIQUE



## I° Contexte de l'étude

### 1- Enjeux économiques

Le rosier est une plante ornementale majeure, en France comme dans le monde entier (France Agri Mer, 2015, 2016). Près de dix millions d'unités sont vendues chaque année en France. La culture du rosier se décline dans plusieurs secteurs d'activités, à destination des particuliers comme des professionnels : parfumerie, fleur coupée, rosier de jardin de pleine terre, potées fleuries d'intérieur ou d'extérieur. L'Anjou est un pôle majeur de production de végétaux en France, notamment pour le rosier (60% de la production française, soit 40% de la production européenne). Une étude menée dans l'équipe Arch-E pour évaluer la perception par les consommateurs de la qualité visuelle des rosiers a permis d'identifier que l'architecture constitue le premier critère de choix (Garbez *et al.*, 2015, 2016). La maîtrise de l'architecture des rosiers, afin de la faire évoluer vers les besoins du marché, suppose de bien comprendre le comportement des bourgeons. En effet, leur débourrement produit un certain nombre d'axes secondaires dont la nature, la longueur et l'orientation dans l'espace conditionnent la qualité visuelle de l'ensemble de la plante (Boumaza *et al.*, 2009), mais également la qualité en termes d'abondance de la floraison et de résistance aux maladies. Les techniques horticoles actuellement utilisées pour maîtriser l'architecture des plantes ornementales sont coûteuses et/ou polluantes (taille, pulvérisation de molécules nanifiantes). Il est désormais bien connu que plusieurs facteurs de l'environnement (disponibilité en eau et en azote, température, qualité et quantité de la lumière, stimulations mécaniques) contribuent de manière importante à l'établissement de l'architecture des plantes, en interaction avec le génotype (Li-Marchetti *et al.*, 2015*a,b*). Ces facteurs pourraient être utilisés afin de contrôler la mise en place de l'architecture pour optimiser la production (diminution des coûts et des intrants chimiques).

L'azote est l'un des principaux macroéléments dont les plantes ont besoin et est présent à hauteur de 3% à 5% dans la matière sèche végétale, contre 0,3% à 1% pour le potassium et 0,05% à 1% pour le phosphore. Sa disponibilité conditionne le développement des plantes puisqu'il entre dans la synthèse des acides nucléiques, des acides aminés, des protéines, des chlorophylles, des régulateurs de croissances, *etc.* L'azote est donc majeur pour l'obtention de rendements agricoles et horticoles satisfaisants qualitativement et quantitativement. L'efficacité globale d'utilisation de l'azote (NUE, Nitrogen Uptake Efficiency) est définie par le rendement en fleurs, grains, fruits ou biomasse, selon le type de culture et la disponibilité



en azote dans le sol. Le calcul qui aboutit à la NUE prend en compte l'efficacité d'absorption et l'efficacité d'utilisation de l'azote, qui est elle-même la résultante de l'efficacité d'assimilation et de l'efficacité de mobilisation (Xu *et al.*, 2012). Dans le cadre de ces travaux, nous cherchons à comprendre dans quelle mesure la plante modèle *Rosa hybrida* utilise l'azote issu de l'absorption courante et mobilise des réserves après la levée de dominance apicale pour alimenter l'allongement des axes II dans différents contextes d'apports en nitrate. Nous avons ainsi souhaité nous intéresser au métabolisme de l'azote au cours de la croissance végétative des rosiers afin de déterminer les stades où les apports d'azote sont déterminants pour l'établissement d'une architecture donnée, tout en réduisant les intrants en faisant varier la disponibilité en nitrate dans la solution nutritive pendant la culture. En effet, l'utilisation d'engrais azotés par l'agriculture moderne, pour optimiser les rendements et la qualité des productions végétales, est de plus en plus néfaste en termes environnementaux et socio-économiques. Il est donc important de proposer aux acteurs de la filière végétale de nouveaux protocoles de culture plus respectueux et proches des enjeux sociétaux.

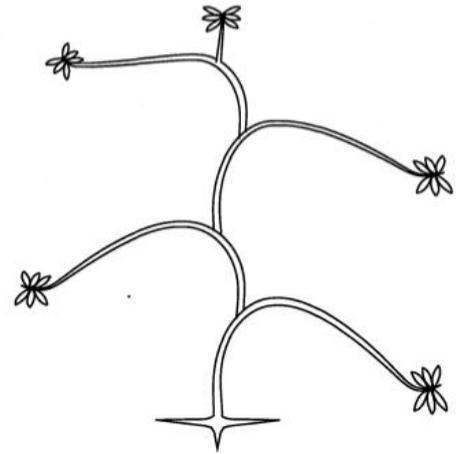
## 2- Histoire et phylogénie

Le rosier fait partie de la famille des Rosacées, qui compte environ 3000 espèces et entre 88 et 100 genres (Xiang *et al.*, 2017). La classification botanique des rosiers fait référence en général aux travaux de Rehder, dont la première publication date de 1927. Selon cette classification, le genre *Rosa* comprend 4 sous-genres : *Hesperodos*, *Platyrhodon*, *Hulthemia* et *Eurosa* (Meynet, 1995). Le sous-genre *Eurosa* est le plus important en nombre de représentants et est divisé en 10 tribus. Les rosiers sauvages, qui comprennent une centaine d'espèces du genre *Rosa*, sont à l'origine de tous les rosiers cultivés. La domestication du rosier a débuté il y a 5000 ans en Chine, en Asie et en Afrique du Nord (Sheperd, 1954; Liorzou *et al.*, 2016), où ses vertus médicinales et figuratives étaient déjà reconnues. Il faut attendre le XIX<sup>ème</sup> siècle en Europe pour que soient initiés les croisements et les hybridations entre des rosiers d'origine européenne et chinoise (Meynet, 2001). Dans la seconde moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, les sélectionneurs ont créé le rosier moderne par hybridation (Meynet, 2001). Jusqu'à nos jours, ils produisent des hybrides possédant de nombreux caractères d'intérêt, tels que la remontée de floraison, des fleurs de grande taille et de couleurs variées, la résistance au froid et aux maladies afin de répondre aux aléas de l'environnement. Environ 20 000 cultivars de rosiers sont actuellement présents sur le marché (Rajapakse *et al.*, 2001). Cette

(a)



(b)



**Figure 1 : architecture du rosier buisson *Rosa hybrida*.**

(a) Sujets âgés de *Rosa hybrida* (photo : Marie-Anne Le Moigne).

(b) Modèle de Champagnat auquel appartient le rosier buisson *Rosa hybrida*, d'après Oldeman (1974).

amélioration variétale est rendue difficile par le nombre de chromosomes de base ( $2n=2x=14$  à  $2n=8x=56$ ) : il existe des espèces diploïdes, triploïdes, tétraploïdes, pentaploïdes, hexaploïdes et octoploïdes (Scariot *et al.*, 2006; Fougère-Danezan *et al.*, 2015). En particulier, l'état polyploïde favorise un état de gigantisme des organes floraux qui est un caractère ornemental important. La manipulation du degré de ploïdie des gamètes chez les diploïdes, associée à la sélection assistée par marqueurs (Debener and Linde, 2009) permettent toutefois d'envisager des hybridations entre des espèces de degré de ploïdie différents (Pécricx *et al.*, 2011; Crespel *et al.*, 2015). Plusieurs gènes majeurs et QTL (Quantitative Trait Loci) incorporant des gènes impliqués dans le nombre de pétales, la date de floraison (Roman *et al.*, 2015), la résistance aux maladies (Linde *et al.*, 2006), le parfum des fleurs (Spiller *et al.*, 2010), et l'architecture (Kawamura *et al.*, 2010) ont été caractérisés.

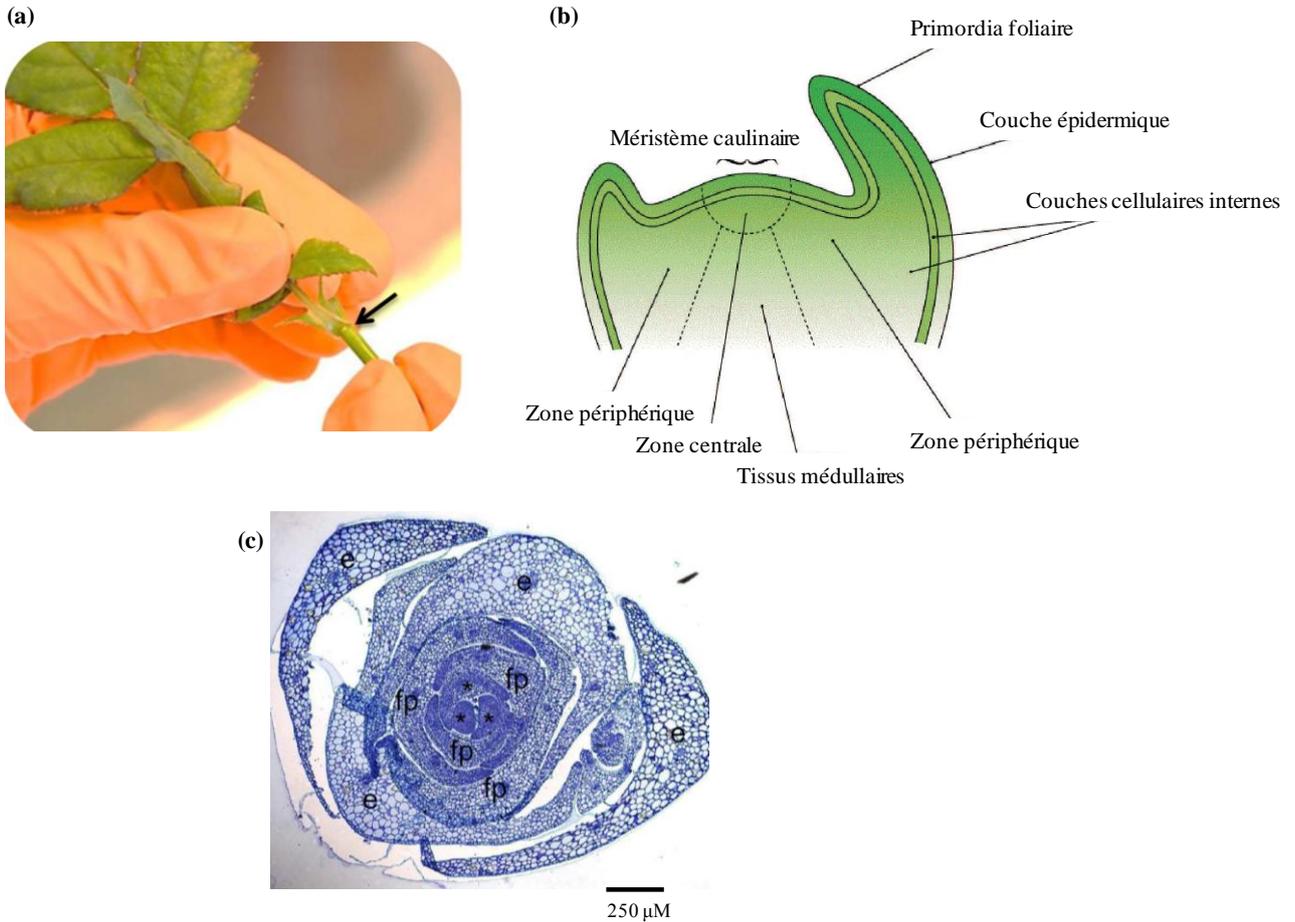
### 3- Architecture de la plante modèle

*Rosa hybrida* (Figure 1a) n'est pas une espèce au sens botanique du terme mais bien une dénomination générique utilisée pour décrire la plupart des cultivars de rosiers modernes issus de l'hybridation avec les rosiers de Chine. Les espèces sont très variables mais s'hybrident facilement, ce qui rend leur délimitation phylogénétique difficile (Zieliński *et al.*, 2004). *Rosa hybrida* 'Radrazz', plante modèle utilisée dans ce travail, est l'un des cultivars tétraploïdes commerciaux de *Rosa hybrida*. Il a été obtenu par le croisement entre les cultivars 'Carefree Beauty' et 'Razzle Dazzle' (<http://utgardens.tennessee.edu>) et introduit par les Établissements Meilland sur le marché français. La floraison de ce rosier buisson remontant s'étale du printemps jusqu'à la fin de l'automne. L'axe primaire (axe I) est composé de 8 à 12 phytomères dont le plus apical est terminé par une fleur (Morel *et al.*, 2012) : la ramification est sympodiale. Les feuilles composées comportent un nombre variable de folioles en fonction de leur position le long de l'axe I. À sa base, les feuilles sont absentes (il n'y a que les stipules) ou sont naines à 5 folioles. Les feuilles supérieures comportent plusieurs folioles (3, puis 5 à 7 de la base vers le sommet). Les deux phytomères les plus apicaux comportent des feuilles formées de 1-3 foliole(s). Les deux bourgeons axillaires les plus apicaux sont sylleptiques (ils débourent dès leur formation), alors que ceux des nœuds sous-jacents sont proleptiques (débourent après une période de repos). *Rosa hybrida* 'Radrazz' présente de nombreux avantages qui ont conduits à l'utiliser comme plante modèle dans l'équipe Arch-E : i) résistance aux maladies, ii) forte floribondité, iii) facilité de bouturage, iv) forte sensibilité aux conditions environnementales, notamment en ce qui concerne le débourement des bourgeons. La levée de dominance apicale initiée par l'entrée



en floraison survient au bout de quelques semaines de culture, ce qui apporte de la souplesse pour l'étude du fonctionnement des bourgeons, qui restent dormants jusqu'au stade « Bouton Floral Visible » de l'axe I.

Le développement architectural d'une plante, concept introduit par Hallé et Oldeman (1970) à la suite de l'observation de la structure et du mode de développement de plantes tropicales, peut être défini comme le déroulement d'une séquence précise et ordonnée d'évènements, faisant appel à la répétition et à l'intégration de divers « niveaux d'organisation » (phytomères ou axes par exemples), dans des conditions écologiques stables et non contraignantes, de la germination à la floraison et qui résulte de l'expression de son patrimoine génétique (Oldeman, 1974). L'architecture est l'expression d'un équilibre constant entre la régulation endogène des processus de croissance et les contraintes exercées par le milieu extérieur (Edelin, 1984). L'architecture repose sur la nature des ramifications (axes florifères ou végétatifs, axes courts ou longs) et leur agencement (axes orthotropes ou plagiotropes, etc). Chez le rosier *Rosa hybrida* 'Radrazz', le débourrement des bourgeons situés le long de l'axe I produit un certain nombre d'axes secondaires dont la longueur et l'orientation dans l'espace conditionne le modèle architectural de Champagnat (Figure 1b), caractéristique du « type buisson ». Aux côtés du rosier *Rosa hybrida* 'Radrazz', on retrouve l'églantier (*Rosa canina*, Rosacées), le néflier (*Mespilus germanica*, Rosacées) et le sureau (*Sambucus nigra* et *Sambucus racemosum*, Adoxacées) par exemple. Le modèle de Champagnat est constitué par la juxtaposition d'axes orthotropes, tous équivalents dont la structure est mixte. De la succession de ces axes, résulte un tronc constitué des segments basaux de chaque axe. L'instabilité verticale de ces axes les conduit à former, sous l'action de la pesanteur, un rayon de courbure plus ou moins marqué en fonction de l'âge des parties distales. Le sommet de la plante est représenté par la partie courbée de ces axes particuliers (Oldeman, 1974), dont l'épitonie est marquée. Chez les sujets âgés, la ramification est basitone, alors que les bourgeons situés le long de l'axe primaire (axe I) débourrent selon un gradient acrotone chez les jeunes plantes : les bourgeons du sommet débourrent préférentiellement à ceux de la base (Crespel *et al.*, 2013; Costes *et al.*, 2014).



## Figure 2 : fonctionnement du bourgeon

(a) Bourgeon axillaire dormant (flèche noire) à l'aisselle d'une feuille chez *Rosa hybrida* (photo : Marie-Anne Le Moigne).

(b) Organisation en trois zones cellulaires du méristème apical caulinaire. La zone centrale est constituée de cellules de petite taille dont l'activité mitotique est peu prononcée. Les cellules y sont sphériques, aux parois minces, indifférenciées et à caractère embryonnaire. Les cellules de la zone périphérique, en forme d'anneau, sont le siège d'intenses mitoses, contrairement à celles de la zone basale. Les mitoses que subissent les cellules de la zone périphérique aboutissent à la formation d'ébauches foliaires et à la réduction de l'aire du sommet du méristème. C'est la phase de l'aire minimale. Activées par les *stimuli* du soulèvement de cette zone, les cellules indifférenciées de la zone centrale alimentent la zone latérale : les cellules se différencient, perdent leur totipotence et sont consommées pour la croissance du méristème. Les cellules de la zone basale, quant à elles, restaurent par mitoses les cellules de la zone centrale : chaque mitose donnant deux cellules identiques, l'une d'entre elles seulement contribue à la formation du nouvel axe. Le stock de cellules reste ainsi constant permettant au méristème d'être actif aussi longtemps que vit la plante. La zone médullaire produit la moelle et les tissus conducteurs (tissus médullaires, Morot-Gaudry *et al.*, 2009).

(c) Coupe transversale d'un bourgeon de *Rosa hybrida* trois jours après l'initiation du débourrement par décapitation. e : écailles, \* : primordia foliaire, fp : feuilles préformées (Girault *et al.*, 2008).

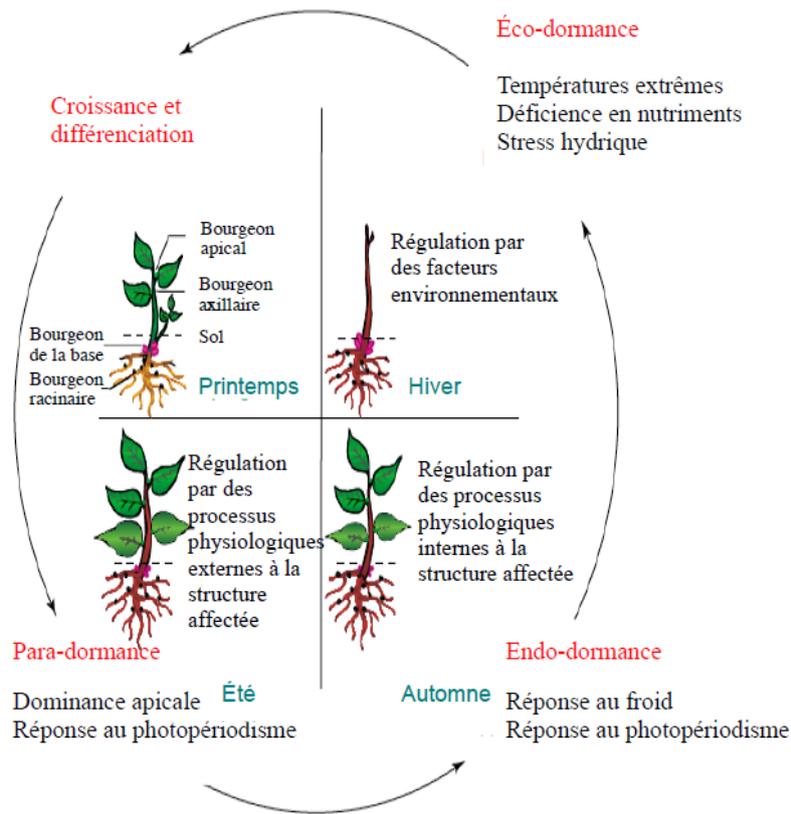
## II° Le débourrement des bourgeons

### 1- Fonctionnement du bourgeon

Les plantes ont développé une grande flexibilité morphogénétique permettant d'adapter en permanence leur développement aux contraintes du milieu qui les entoure. Cette croissance est rendue possible par la présence d'un méristème apical caulinaire ou MAC (Figure 2), qui est une zone pluricellulaire structurée (Morot-Gaudry *et al.*, 2009), dont le développement est en partie contrôlé par l'environnement. On parle de « MAC végétatif » ou « MAC inflorescentiel », selon que le méristème produise respectivement des *primordia* foliaires ou floraux. Ainsi, le méristème apical caulinaire est le site de l'organogénèse de la partie aérienne de la plante. Le MAC aérien produit une suite de phytomères qui met en place l'architecture de la plante. Le MAC produit d'autres méristèmes contenus dans les bourgeons. Ce sont des organes complexes composés d'un axe très court (future tige avec entre-nœuds, futur rameau ou future fleur) qui porte des ébauches foliaires imbriquées et des écailles protectrices, recouvrant le MAC. En fonction de leur position, on distingue i) les bourgeons terminaux qui se situent à l'extrémité des tiges ou des rameaux, ii) les bourgeons axillaires qui se situent à l'aisselle des feuilles et qui sont des formations initiales de futures ramifications et enfin iii) les bourgeons adventifs formés de façon naturelle ou à la suite d'une blessure, sur n'importe quelle partie de la plante.

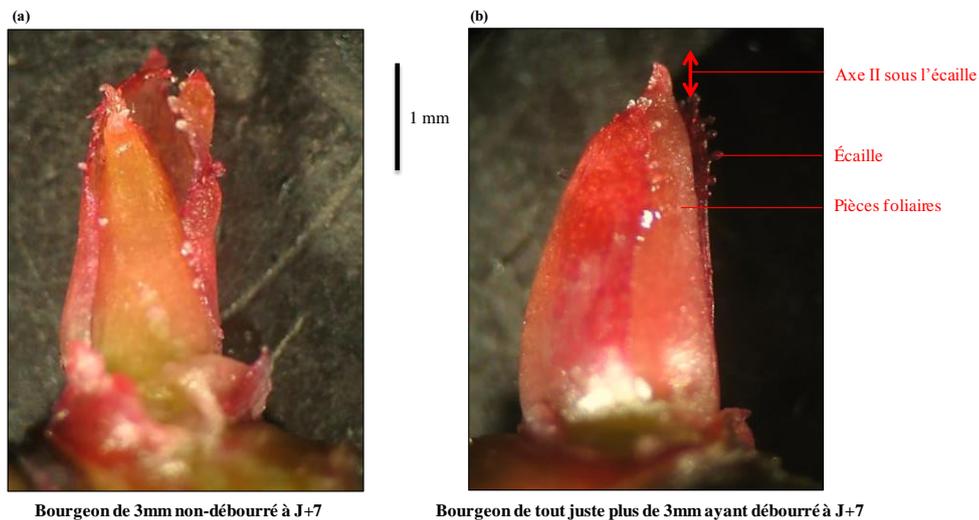
Ainsi, après sa formation, un bourgeon peut aussitôt produire une tige (rameau sylleptique) ou rester latent avant de débourrer (rameau proleptique). La dormance est définie comme étant une suspension temporaire de la croissance de toute structure végétale contenant un méristème. Plusieurs études ont d'ailleurs rapproché le fonctionnement du bourgeon de celui de la graine, qui sont tous les deux des structures en dormance qui deviennent spontanément actives en réponse aux signaux de l'environnement (Chao *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2015). Les bourgeons peuvent être soumis à plusieurs types de dormance (décrits d'après l'origine de l'arrêt de croissance et des besoins spécifiques pour le rompre) qui se succèdent au cours du cycle annuel de la plante (Figure 3, Horvath *et al.*, 2003) :

i) L'endodormance est induite par une inhibition de croissance dont l'origine se situe au sein même du méristème. La lumière et la température interagissent très fortement dans l'initiation et la levée de l'endodormance chez beaucoup de plantes pérennes. À l'automne, les plantes perçoivent le raccourcissement de la photopériode (implication du phytochrome *phyA*,



**Figure 3 : représentation des signaux et des saisons typiques correspondant aux différents types de dormance et aux saisons associées, définis par Lang *et al.* (1987).**

Figure traduite d'après Horvath *et al.* (2003).



**Figure 4 : aspect des bourgeons.**

(a) Non débourré : la dissection permet de montrer que la 4<sup>ème</sup> écaille recouvre les pièces foliaires.  
 (b) Ayant débourré : l'axe II en début de développement écarte les écailles et émerge au sommet du bourgeon (flèche rouge).

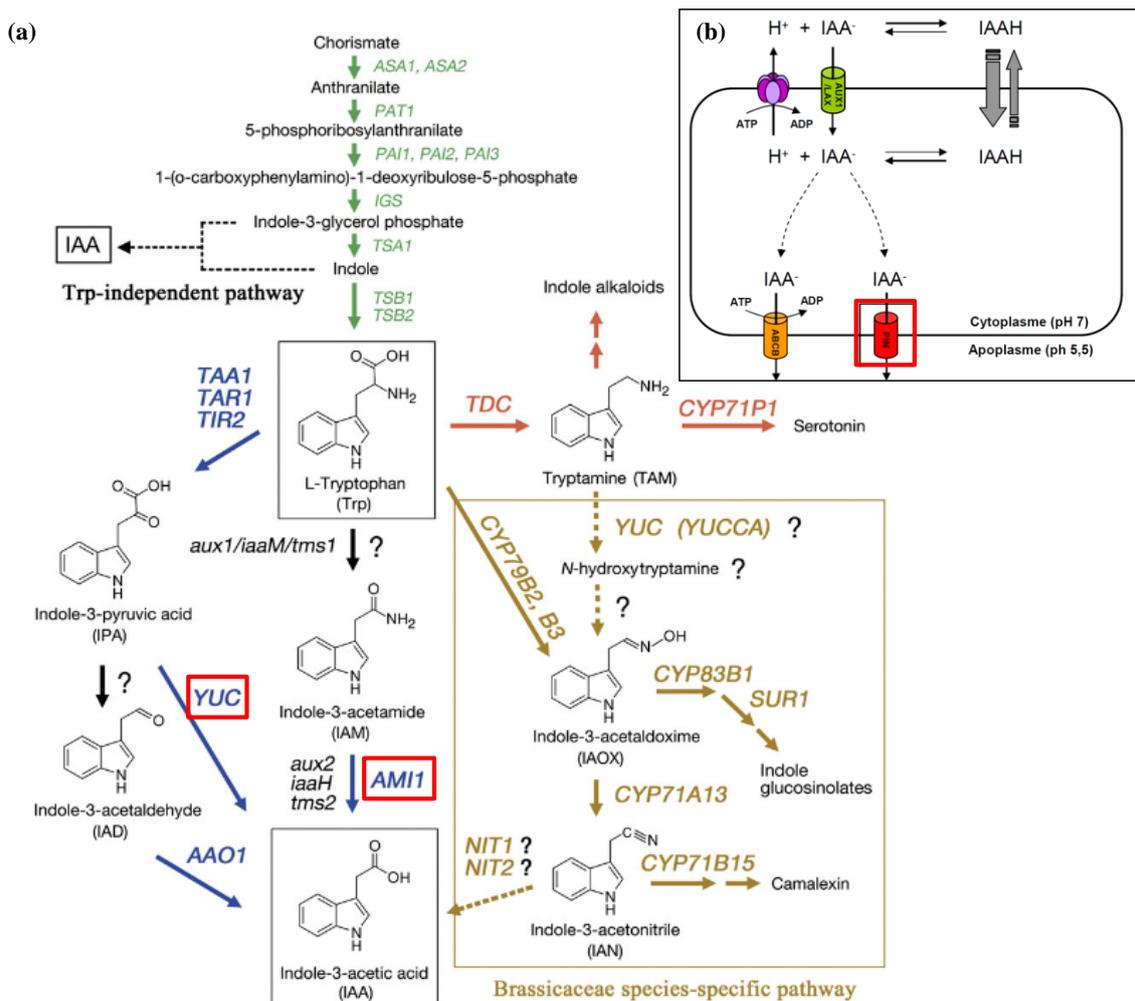
La barre noire représente l'échelle.  
 Photos : Marie-Anne Le Moigne.

Chao *et al.*, 2007) et la baisse des températures. Ces conditions sont défavorables pour la croissance et conduisent à l'entrée des bourgeons en endodormance. Ce type de dormance est levé au cours de l'hiver par l'action du froid. Cette période de froid est nécessaire pour induire le débourrement printanier et la durée nécessaire en basses températures (vernalisation) dépend de l'espèce considérée. Des phénomènes épigénétiques ont été associés à la régulation de ce type de dormance (Cooke *et al.*, 2012, Carneros *et al.*, 2017).

ii) Au cours de l'hiver, les bourgeons deviennent écodormants. L'écodormance est un type de dormance induit par des facteurs environnementaux défavorables tels que les déficiences en nutriments, les stress hydriques, les niveaux limitants en CO<sub>2</sub> et O<sub>2</sub>, les conditions extrêmes de température ou de lumière (Horvath *et al.*, 2003). Le méristème reprend son activité lorsque les conditions environnementales redeviennent favorables (température et longueur du jour). Cependant, tous les bourgeons ne débourrent pas au printemps, certains restants paradormants.

iii) **La paradormance décrit une dormance induite par des facteurs internes à la plante, mais externes à l'organe affecté, telles que les inhibitions corrélatives, exercées à plus ou moins longue distance par d'autres organes de la plante.** Cette dormance s'exerce par exemple entre les parties aériennes et les racines (Richards and Rowe, 1977), entre une feuille et le bourgeon situé à son aisselle (Zieslin and Halevy, 1976), et entre les écailles du bourgeon et le méristème qu'elles protègent (Lang *et al.*, 1987). Le cas de paradormance le mieux renseigné est relatif à la dominance apicale, dont le fonctionnement en lien avec le métabolisme de l'azote est au centre de ce travail.

D'après Cline (1997), le débourrement comprend quatre étapes successives : i) la formation du bourgeon axillaire (organogénèse), ii) l'entrée en dormance des bourgeons, iii) la sortie de dormance des bourgeons et iv) l'allongement des axes II qui en sont issus. L'allongement correspond à la reprise de croissance des pièces préformées (jeunes feuilles, entre-nœuds) et de l'organogénèse du méristème apical caulinaire. Chez le rosier, le bourgeon est considéré comme ayant débouillé lorsque le sommet de la première feuille préformée devient visible après avoir écarté les écailles protectrices (Girault *et al.*, 2008, illustration de bourgeons disséqués dans le cadre de ces travaux en Figure 4). Ce stade est atteint environ quatre jours après l'initiation du débourrement. On distingue donc l'allongement au sein du bourgeon, qui est la dernière étape du débourrement, de l'allongement visible à l'œil nu qui correspond au stade à partir duquel l'axe II écarte les écailles et croît en longueur.



**Figure 5 : voies de synthèse et de transport de l'auxine (IAA, acide indole-3-acétique).**

(a) Voies de biosynthèse de l'auxine à partir du tryptophane (acide aminé issu du chorismate). Les deux voies principales font appel aux gènes qui codent les enzymes de la famille des YUCCA qui convertissent l'acide indole-3-pyruvique (voie de l'IPA) en auxine et de la famille des amidases AMI1 qui transforment l'indole-3-acétamide (voie de l'IAM) en auxine (d'après Mano and Nemoto, 2012).

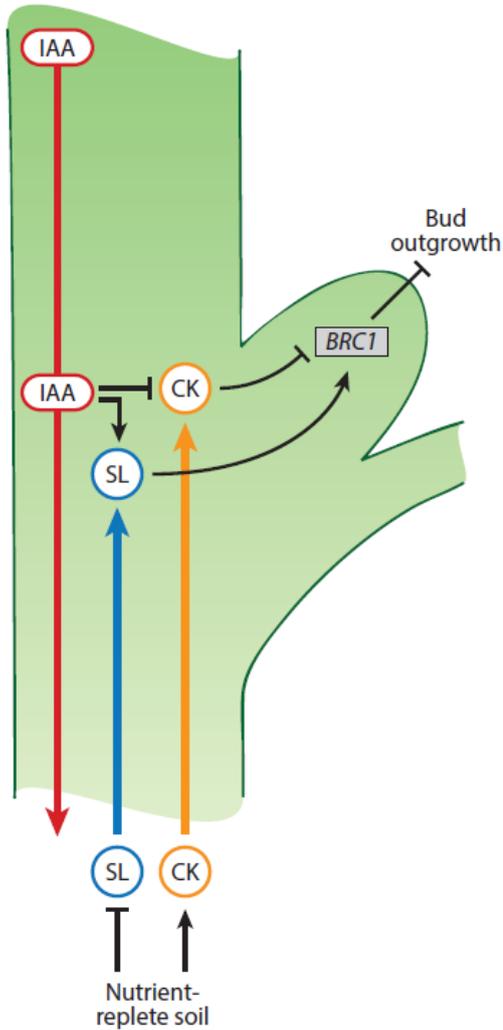
(b) Transport de l'auxine à travers la membrane plasmique. La forme protonée et lipophile de l'auxine (acidification de l'apoplasme par les pompes à protons) diffuse passivement vers le cytoplasme, tandis que la forme déprotonée est transportée activement par les co-transporteurs de la famille des AUX/LAX. Les protéines PIN et ABCB permettent quant à eux l'efflux d'auxine hors de la cellule (d'après Barbier *et al.*, 2014).

Dans le cadre de ces travaux, les gènes *YUC1* et *PIN1* ont été étudiés en q-PCR et un gène codant une amidase (*AMI1*) a été retrouvé par l'approche RNAseq en réponse au nitrate (encadrés en rouge).

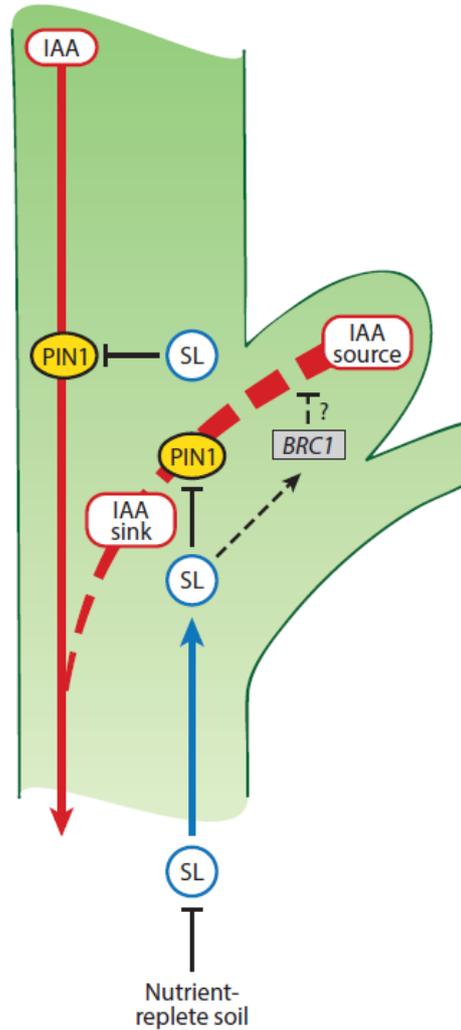
## 2- Les régulateurs de croissance impliqués dans la dominance apicale

Chez *Rosa hybrida*, les bourgeons sont soumis à la dominance apicale (Snow, 1925; Sachs and Thimann, 1964, 1967, Cline, 1994, 1997). Ce type de paradormance repose sur la production d'un régulateur **de croissance inhibiteur du débourrement, l'auxine**, dans l'apex des plantes (bouton floral et jeunes feuilles, voies de biosynthèse décrites en Figure 5a), son transport basipète le long de la tige (Figure 5b, PATS pour Polar Auxin Transport Stream) et son interaction avec d'autres régulateurs de croissance au voisinage des bourgeons pour réguler leur état d'activité (Domagalska & Leyser, 2011). En effet, l'auxine ne peut être importée directement de la tige vers le bourgeon et agit indirectement au travers de la régulation d'un intermédiaire (modèle du messenger secondaire, Figure 6a, Hall and Hillman, 1975; Prasad *et al.*, 1993). À l'inverse, **les cytokinines** (substances proches des bases puriques, Figures 7 et 8) et les **strigolactones** (substances dérivées du métabolisme des caroténoïdes, Figure 9), régulateurs de croissance **stimulant et réprimant respectivement le débourrement**, agissent de manière directe (Cline, 1994; Beveridge, 2000; Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Waters *et al.*, 2017). Ces trois principaux régulateurs de croissance forment un réseau complexe de signaux échangés entre les différents organes de la plante au cours du débourrement. L'auxine en provenance de l'apex inhibe la production des cytokinines (Tanaka *et al.*, 2006) et stimule la production et la signalisation par les strigolactones (Brewer *et al.*, 2009; Hayward *et al.*, 2009), ce qui aboutit au maintien de l'état de dormance des bourgeons. Cette voie implique au moins en partie la régulation du gène *BRC1* (*BRANCHED1*) codant un facteur de transcription central dans l'inhibition du débourrement chez l'arabette (Aguilar-Martinez *et al.*, 2007; Gonzalez-Grandio *et al.*, 2013; Seale *et al.*, 2017), le chrysanthème (Chen *et al.*, 2013b), le rosier (Roman *et al.*, 2016) et le pois (Braun *et al.*, 2012). Les cytokinines inhibent le niveau d'accumulation des transcrits de ce gène (Dun *et al.*, 2012; Roman *et al.*, 2016), alors que les strigolactones (Braun *et al.*, 2012; Dun *et al.*, 2012) et l'auxine présente dans la tige (Seale *et al.*, 2017) le stimulent. Après la levée de dominance apicale, les bourgeons axillaires qui débourrent produisent à leur tour de l'auxine (modèle de canalisation de l'auxine, Figure 6b) et l'exportent vers les bourgeons sous-jacents le long de la tige pour réguler leur état de dormance. Ils deviennent alors eux-mêmes capables d'attirer les éléments nutritifs pour initier l'allongement de l'axe II (Ferguson & Beveridge, 2009). Ainsi, le débourrement serait la résultante d'interconnexions entre les deux modèles de la dominance apicale (canalisation de l'auxine et second messenger) et les aspects trophiques.

(a) Modèle du messager secondaire



(b) Modèle de canalisation de l'auxine



**Figure 6 : modèles de régulation du débourrement des bourgeons axillaires soumis à la dominance apicale.**

(a) Modèle du messager secondaire.

(b) Modèle de canalisation de l'auxine.

Dans ces deux modèles, qui ne sont pas mutuellement exclusifs, la disponibilité en nutriments dans le sol influence la production des régulateurs de croissance dans les racines. *BRC1* : facteur de transcription *BRANCHED1*, CK : cytokinin, IAA auxine (Indole-3-Acétique Acid), PIN1 : PIN-FORMED1, SL : strigolactones. Les flèches épaisses représentent les flux de molécules et les flèches noires leurs effets. Tiré de Waters *et al.*, 2017.

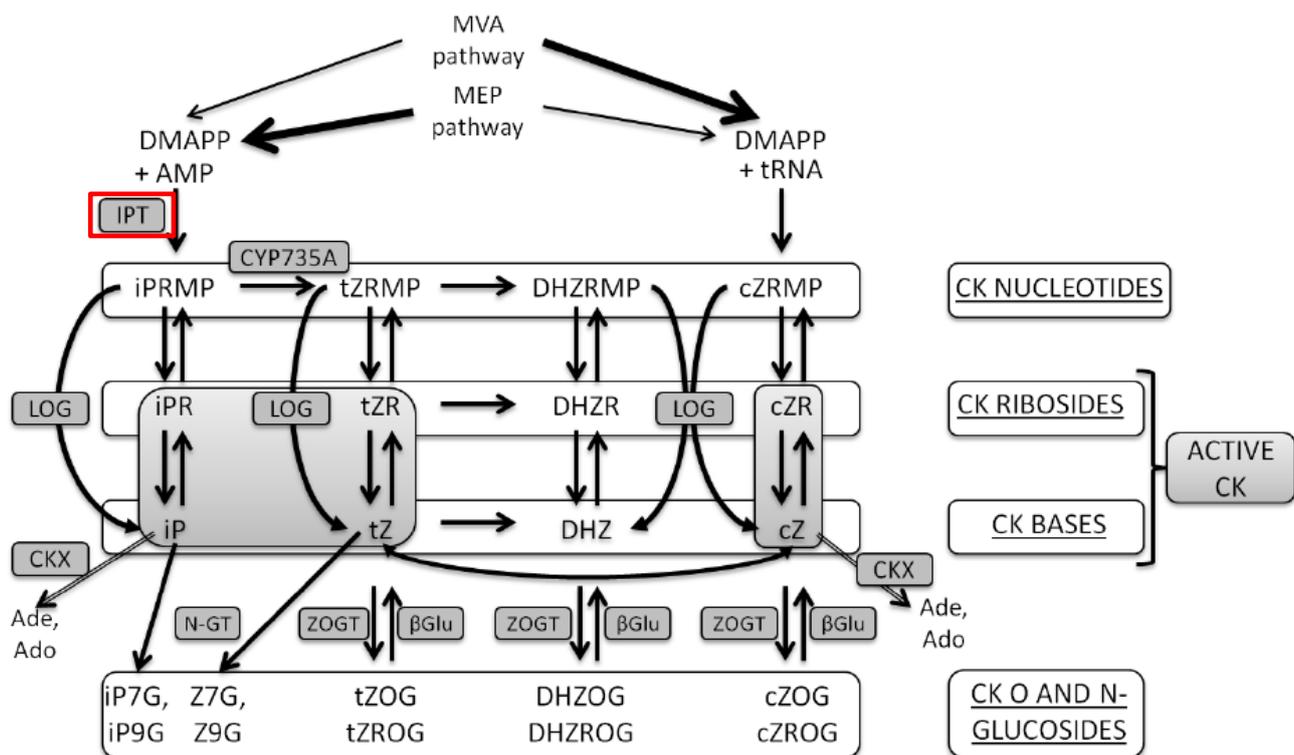
Contrairement à certaines plantes comme l'arabette, la tomate ou le peuplier, les bourgeons du rosier ont un besoin absolu de lumière pour débourrer (Khayat and Zieslin, 1982; Girault *et al.*, 2008), ce photocontrôle impliquant la régulation du métabolisme des régulateurs de croissances. La lumière (signal perçu par le phytochrome phyB) régule la synthèse des cytokinines dans la tige au voisinage du bourgeon (*IPT3* notamment) et leur transport pour initier le débourrement (*PUP5* : Purine Permease 5), tout en inhibant leur dégradation (*CKX* : CytoKinines oXidases). Les cytokinines initient le débourrement en régulant un nombre important de gènes clés impliqués dans le débourrement (signalisation des strigolactones, métabolisme et transport de l'auxine et des sucres, division et expansion cellulaires (Roman *et al.*, 2016). Les strigolactones sont synthétisées dans les racines et transportées dans la sève xylémienne de manière acropète. Les gènes impliqués dans leur biosynthèse (*MAX1/3/4*, *More AXillary growth*) sont également exprimés dans la tige au voisinage des bourgeons dormants (Djennane *et al.*, 2014). Il existe un photocontrôle local de la signalisation par les strigolactones au cours du débourrement chez le rosier : l'inhibition du débourrement des bourgeons apicaux placés à l'obscurité est corrélée à une accumulation du niveau des transcrits du gène *MAX2*, impliqué dans la signalisation par les strigolactones, alors que les tissus à la base de l'axe I maintenus à la lumière sont capables de produire des axes II (Djennane *et al.*, 2014).

En aval de la perception des signaux transmis par les régulateurs de croissance qui contrôlent le débourrement, l'alimentation du bourgeon est une étape importante qui conditionne l'allongement de l'axe II végétatif qu'il renferme et la mise en place de l'architecture. Dans les premières phases qui suivent la levée de dominance apicale, le bourgeon et le nouvel axe feuillé sont des tissus hétérotrophes qui nécessitent un flux de matière organique provenant du reste de la plante. Parmi les flux de matière, les flux de molécules azotées et carbonées sont très importants pour la constitution du nouvel axe (Ferguson and Beveridge, 2009).

### **III° Régulation du débourrement et de l'allongement des axes II par l'azote**

#### **1- Effet de la disponibilité en azote sur l'architecture des plantes**

La disponibilité en eau (Demotes-Mainard *et al.*, 2013; Li-Marchetti *et al.*, 2015a) et en azote dans le sol sont connus pour être impliqués dans l'architecture. Il est clairement établi, chez les plantes herbacées et ligneuses, qu'un fort niveau de fertilisation en azote (nitrate



**Figure 7 : modèle des voies de biosynthèse et de dégradation des différentes formes des cytokinines.**

Les cytokinines sont un type de régulateurs de croissance issu du diméthylallyl-diphosphate (DMAPP), formé par la voie du méthylérythritol phosphate (MEP) ou par la voie du mévalonate (MVA). La régulation de l'accumulation des formes intermédiaires actives (ribosides et bases) et inactives (nucléotides et glucosides) est complexe (figure produite au cours de la thèse d'H. Roman dans l'équipe Arch-E, adaptée d'après Frebort *et al.*, 2011; Kieber and Schaller, 2014; Roman *et al.*, 2016; Sakakibara, 2006). Les gènes majeurs sont ceux des familles *IPT* (Adenosine Phosphate-Isopentenyltransférases) et *CKX* (Cytokinin Oxidases), respectivement responsables de la première étape de la voie de biosynthèse des cytokinines et de leur catabolisme en adénine (Ade) et en adénosine (Ado).

Dans le cadre de ces travaux, le gène *IPT3* (encadré en rouge) a été étudié en q-PCR et retrouvé par l'approche RNAseq en réponse au nitrate.

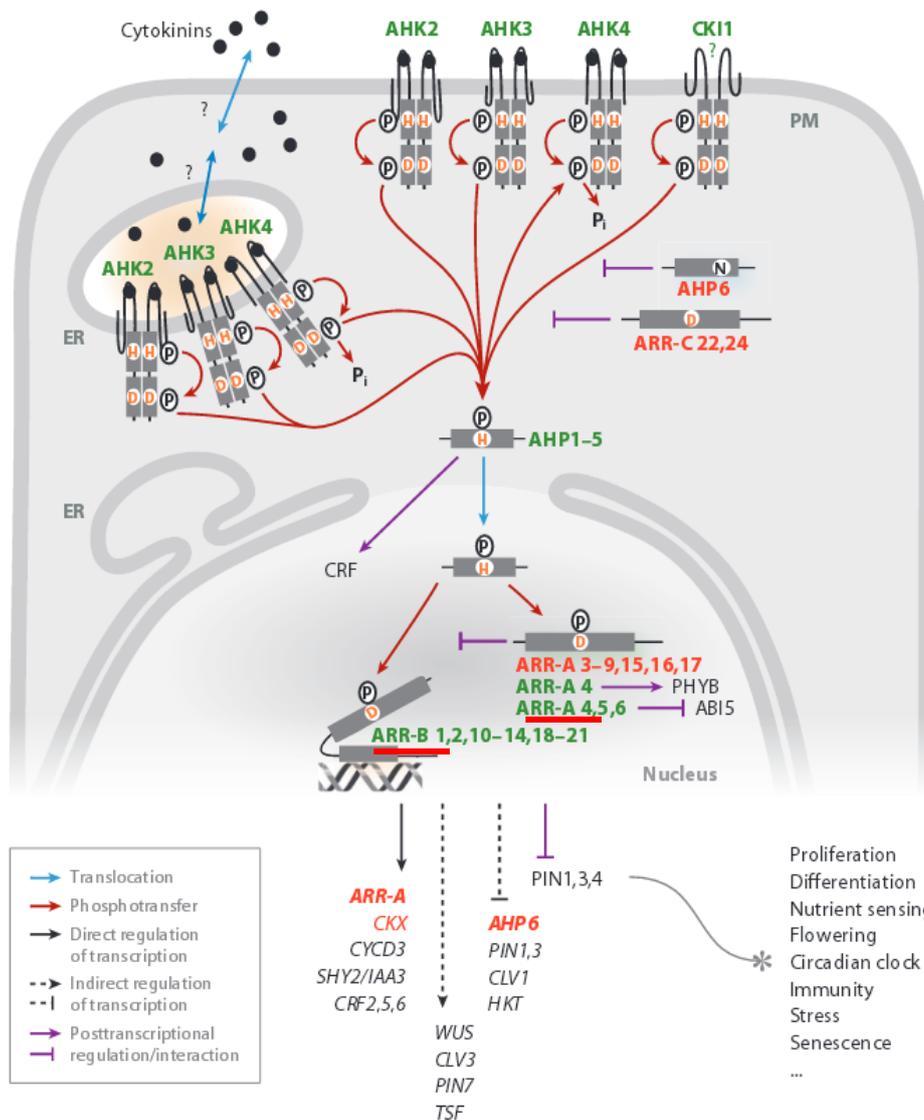
et/ou ammonium) aboutit i) à un nombre important de bourgeons qui débourent (Lortie and Aarssen, 1997; Médiène *et al.*, 2002; Emarat-Pardaz *et al.*, 2013; Furet *et al.*, 2013; Pal *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016b) et ii) à une amélioration de la croissance des bourgeons qui en sont issus (Thitithanakul *et al.*, 2012; Thitithanakul, 2013). Chez le riz, un fort apport de nitrate d'ammonium augmente le nombre de talles (Li *et al.*, 2016b) et le nombre de fleurs dans les panicules (Ding *et al.*, 2014), tandis qu'une carence inhibe l'élongation des talles en régulant la division cellulaire (Luo *et al.*, 2017).

Chez *Rosa hybrida*, l'équipe Arch-E a démontré qu'il est possible d'obtenir plusieurs phénotypes en faisant varier la concentration en nitrate pendant plusieurs semaines. Le nombre de bourgeons qui débourent le long de l'axe est d'autant plus élevé que le nitrate est concentré dans la solution nutritive, permettant alors à la plante de développer à la fois une croissance en hauteur et en épaisseur chez les sujets âgés (Huché-Thélier *et al.*, 2011). Un apport d'azote après une longue période de carence provoque l'augmentation du taux de débourement des bourgeons de la base (Huché-Thélier *et al.*, 2011), ce qui avait été préalablement montré chez le rhododendron (Fustec and Beaujard, 2000) et le pêcher (Médiène *et al.*, 2002). Une seconde étude a été réalisée plus récemment dans l'équipe Arch-E à l'échelle de la plante entière décapitée et chez des individus plus juvéniles (quatre à six semaines). Seule une forte concentration en nitrate (12,25 mM) permet le débourement des bourgeons de la base de l'axe I en condition de fort éclaircissement ( $450 \mu\text{moles de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , Furet *et al.*, 2013). Ainsi, la concentration en nitrate dans l'environnement racinaire conditionne le débourement des bourgeons et donc l'architecture globale des plantes. Cependant, une fois absorbé dans les racines, le nitrate est assimilé en de nombreuses molécules et n'est pas nécessairement impliqué par lui-même dans l'alimentation en azote des axes II. La nature, les voies métaboliques et l'origine des molécules azotées chargées dans les bourgeons dans les premières heures qui suivent la levée de dominance apicale restent encore inconnues et constituent la base de ces travaux.

## 2- Métabolisme de l'azote

### a- Absorption et assimilation du nitrate

L'azote prélevé dans le sol est majoritairement présent sous forme de nitrate et d'ammonium, ainsi que d'acides aminés, dans une moindre mesure. Les plantes sont



**Figure 8 : Modèle de la perception des cytokinines à l'échelle d'une cellule.**

Les récepteurs membranaires de type histidine kinase (AHK2, AHK3, AHK4 pour *Arabidopsis* Histidine Kinase) situés à surface de la membrane plasmique (PM) et du réticulum endoplasmique (RE) perçoivent les cytokinines (ronds noirs), ce qui entraîne une cascade de phosphorylation impliquant les protéines histidine phosphotransferase (AHP1-5) et aboutissant à l'activation des régulateurs de réponses (ARR1 à 21, pour *Arabidopsis* Response Regulator) dans le noyau (d'après Hwang and Müller, 2012).

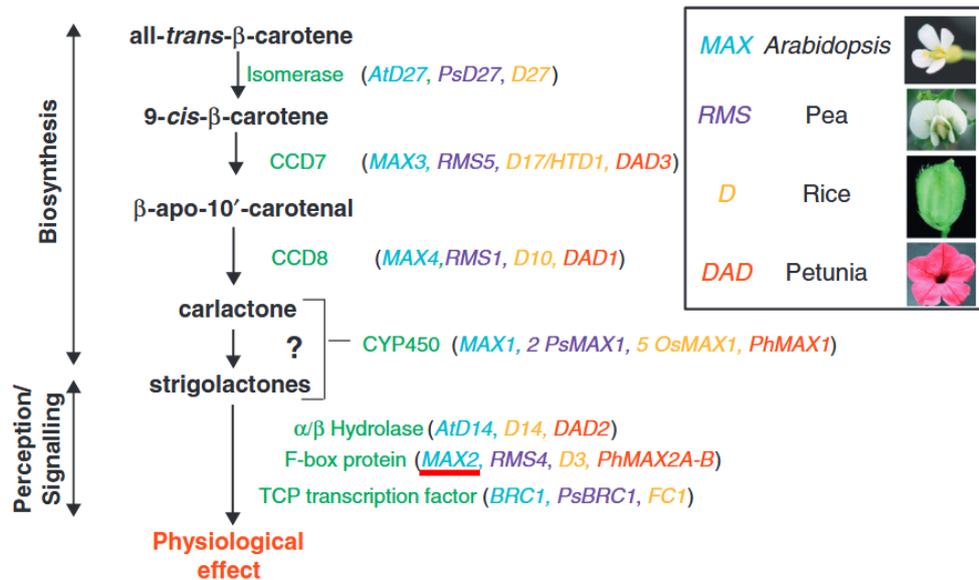
Un gène impliqué dans la signalisation par les cytokinines (*ARR5*) a fait l'objet d'une étude par q-PCR et deux séquences relatives au gène *ARR1* ont été isolées par l'approche RNAseq en réponse au nitrate (soulignés en rouge).

tributaires de la disponibilité en azote dans le sol et l'absorbent principalement à l'aide de transporteurs de nitrate et d'ammonium présents sur les poils racinaires.

Lorsque la concentration en nitrate dans le sol est importante (supérieure à 0,5 mM), ce sont les transporteurs de la famille NPF (Nitrate Transporter1 (NRT1) / Peptide transporter (PTR) family, Lérán *et al.*, 2014) qui assurent le transport à faible affinité (LATS pour « Low Affinity Transport System »). À l'heure actuelle, 53 membres de cette famille de transporteurs ont été identifiés chez l'arabette, dont seulement un tiers ont été caractérisés pour leur activité de transport de nitrate (Krapp *et al.*, 2014; Lérán *et al.*, 2014). Le gène le plus étudié reste actuellement *NRT1.1/NPF6.3*, qui possède une double affinité pour le nitrate et agit comme un senseur du nitrate (Liu & Tsay, 2003, notion de « transcepteur » proposée par l'équipe de Gojon (2011).

Lorsque la concentration en nitrate dans le sol est faible (inférieure à 200 µM), des transporteurs de la famille NRT2 assurent le transport à haute affinité du nitrate (HATS pour « High Affinity Transport System », Orsel *et al.*, 2002). Les gènes codant les différents isoformes de cette famille sont exprimés de manière constitutive (cHATS), et leur niveau d'expression augmente lorsque l'azote est disponible sous forme de nitrate. Les gènes *NRT2.1*, *NRT2.2* et *NRT2.4* codent des transporteurs impliqués dans l'absorption racinaire du nitrate (Filleur *et al.*, 2001; Kiba *et al.*, 2012), alors que les autres gènes de la famille *NRT2* sont plutôt impliqués dans le transport du nitrate entre les différents organes de la plante (Krapp *et al.*, 2014). Le gène *NRT2.4* est également surexprimé dans le phloème des pétioles des feuilles chez les plantes soumises à une carence en nitrate (Kiba *et al.*, 2012). L'absorption d'ammonium fait appel à des transporteurs codés par des gènes *AMT* (Ammonium Transporter, von Wirén *et al.*, 2000; Von Wittgenstein *et al.*, 2014). Chez l'arabette, l'ammonium est ainsi préférentiellement absorbé lorsque les concentrations en nitrate et en ammonium sont égales ou faibles au voisinage des racines (Gazzarrini *et al.*, 1999).

Une fois transporté de l'environnement extérieur vers l'intérieur des cellules des racines, le nitrate peut suivre plusieurs orientations. i) Il peut être stocké dans les vacuoles pour assurer des réserves et participer au maintien de la turgescence des cellules, ii) être directement exporté dans la sève, iii) ou réduit et assimilé. Dans les premières minutes qui suivent son absorption, il stimule les gènes qui gouvernent son assimilation puis son transport, mais les bases moléculaires de cette régulation ne sont qu'encore incomplètement identifiées. Parmi elles, les facteurs de transcription NLP7 et ANR1 sont des acteurs majeurs dans le noyau des



**Figure 9 : principaux acteurs de la voie de synthèse et de signalisation des strigolactones.**

(a) Les strigolactones sont des dérivés de caroténoïdes dont la synthèse est sous la dépendance des gènes codant des isomérases, des Carotenoid Cleavage Dioxygénases (CCD) et le cytochrome 450 (CYP450, de Saint Germain *et al.*, 2013).

(b) La signalisation par les strigolactones fait appel à une  $\alpha/\beta$  hydrolase et une protéine F-box (MAX2) qui sont impliquées dans la perception de ce type de régulateurs de croissance, ainsi qu'au facteur de transcription BRC1 impliqué dans la transduction de ce signal.

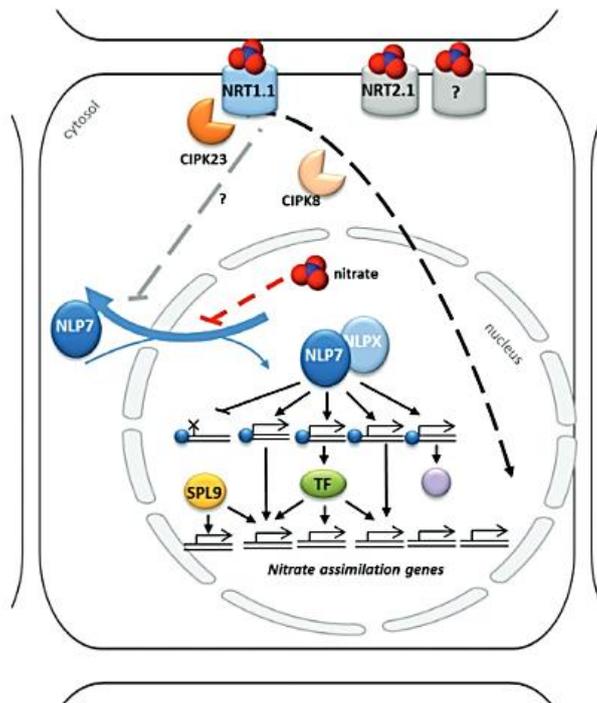
Ces différents acteurs ont été identifiés chez l'arabette (bleu), le pois (violet), le riz (jaune) et le pétunia (rouge).

Le gène souligné en rouge impliqué dans la signalisation par les strigolactones (MAX2) a fait l'objet d'une étude par q-PCR.

cellules : les gènes *NIA1* et *NIA2*, codant la Nitrate réductase qui permet la réduction du nitrate en nitrites est inhibé chez les mutants *nlp7-1* et *nlp7-2* (Figure 10), et les teneurs en acides aminés s'en trouvent affectées (Krapp *et al.*, 2011). Le nitrate est réduit en nitrites dans le cytoplasme dans les racines chez les plantes ligneuses, alors que cette étape est généralement réalisée dans les parties aériennes chez les plantes herbacées (Smirnoff *et al.*, 1984; Gojon *et al.*, 2011), après exportation du nitrate dans la sève xylémienne. Les nitrites issus de la réduction du nitrate sont toxiques et sont transportés dans les plastides des racines (plantes ligneuses) ou les chloroplastes (plantes herbacées), où ils sont réduits en ammonium par la Nitrite réductase (NiR, Meyer & Stitt, 2001). L'ammonium est à son tour assimilé au travers de l'activité d'enzymes essentielles, la Glutamine synthétase (GS) et la Glutamate synthase (GOGAT pour « Glutamate OxoGlutarate Amino Transférase ») : c'est le cycle GS/GOGAT. La Glutamine synthétase permet l'incorporation d'une molécule d'ammonium sur le glutamate, aboutissant à la formation de glutamine. Cet acide aminé est alors pris en charge par la GOGAT qui catalyse le transfert du groupement amide de la glutamine sur l' $\alpha$ -cétoglutarate pour former deux molécules de glutamate. L'une d'entre elles réalimente le cycle GS/GOGAT, tandis que l'autre contribue par transaminations à la synthèse des autres acides aminés (Coruzzi, 2003), dont l'aspartate, produit à partir du glutamate par l'AAT (Aspartate Amino Transférase) et l'asparagine. L'Asparagine synthase catalyse le transfert d'un groupement amide issu de la glutamine (ou directement une molécule d'ammonium, Nakamura *et al.*, 1981; Scofield *et al.*, 1990) sur une molécule d'aspartate pour former de l'asparagine (Figure 11) qui contribue au transport, au stockage et à l'assimilation de l'azote dans la plante (Figures 12 et 13, Lea *et al.*, 2007; Gaufichon *et al.*, 2010; Hildebrandt *et al.*, 2015).

#### b- Transport des molécules azotées

Chez les plantes ligneuses, les acides aminés synthétisés dans les racines sont exportés dans le xylème vers les parties aériennes. Les mouvements d'acides aminés qui transitent par la sève entre les organes incluent le chargement (actif contre un gradient de concentration, par un co-transport de protons) et le déchargement des molécules dans le phloème. C'est un complexe conducteur formé de cellules vivantes allongées, sans noyau, connectées par des cribles (tubes criblés), qui sont accolées aux cellules compagnes et entourées d'un parenchyme vasculaire. Ces mouvements ne peuvent s'y effectuer qu'au travers d'une importante activité de transporteurs à sélectivité et/ou affinité spécifique(s). Il existe cinq



**Figure 10 : schéma hypothétique de la signalisation par le nitrate.**

La protéine CIPK23 (CBL-interacting protein kinase) régule l'affinité du transcepteur NRT1.1 pour le nitrate, tandis que la protéine CIPK8 régule quant à elle le niveau d'accumulation des transcrits de nombreux gènes d'assimilation du nitrate. Le facteur de transcription NLP7 (NIN-LIKE PROTEIN 7) est stimulé par le nitrate dans le noyau, et régule l'expression des gènes d'assimilation et de transport du nitrate, au côté d'autres facteurs de transcription tel que la protéine SPL9 (Krapp *et al.*, 2014).

familles de transporteurs d'acides aminés chez l'arabette (Fischer *et al.*, 1998; Rentsch *et al.*, 2007; Tegeder and Rentsch, 2010; Tegeder, 2014), ainsi que trois familles de transporteurs de peptides (Figure 14) :

- La famille de transporteurs d'acides aminés AAP (Amino Acid / Auxin Permease) ou ATF (Amino acid Transporter Family), qui comprend elle-même plusieurs sous-familles. i) La sous-famille des AAP (Amino Acid Permease) transporte des acides aminés neutres (asparagine, sérine, thréonine, glutamine) et le glutamate. Par exemple, le transporteur AAP2 (Amino Acid Permease 2) est localisé dans le phloème chez l'arabette et régule la distribution des acides aminés entre les graines et les axes II (Zhang *et al.*, 2010; Kohl *et al.*, 2012). ii) La sous-famille des LHT (Lysine and Histidine Transporter) transporte les acides aminés neutres, la lysine et l'histidine. iii) La sous-famille ProT (Proline Transporter) transporte la proline. iv) La sous-famille GAT (GABA Transporter) transporte le GABA et ses proches composés. v) La sous-famille ANT (Aromatic Neutral amino acid Transporter) transporte des acides aminés neutres et aromatiques.

- La famille des APC (Amino acid Polyamine Choline), dont la sous-famille CAT (Cationic Amino acid Transporter) transporte des acides aminés neutres.

- La famille OEP16 (« plastid Outer Envelope Porin of 16 kDa) ou PRAT (PRotein and Amino acid Transport) transporte la protéine OEP16 chez le pois et divers acides aminés et amines.

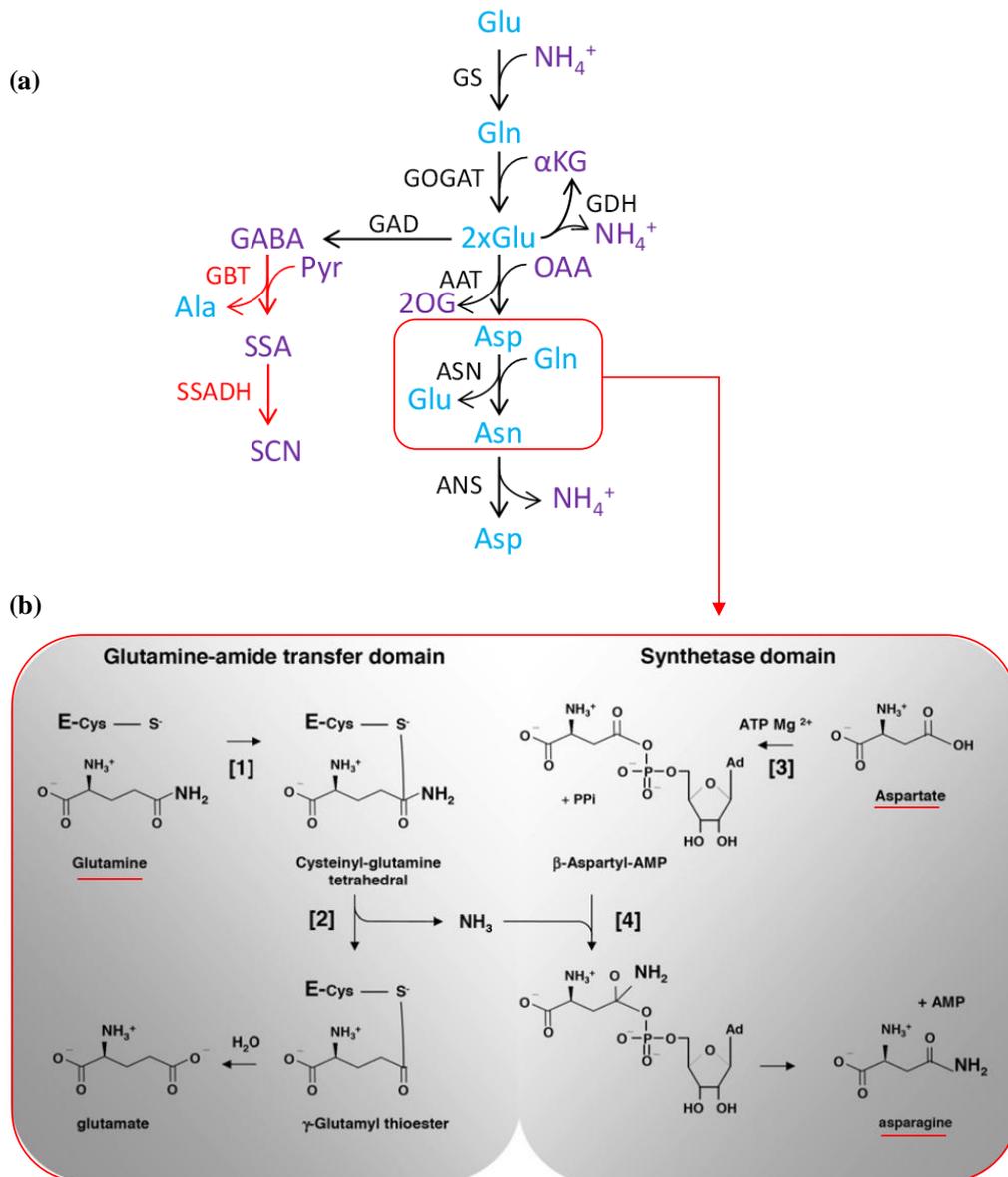
- La famille des MCF (Mitochondrial Carrier Family) sont des transporteurs qui prennent en charge l'arginine, l'histidine, l'ornithine et la lysine dans les mitochondries.

- La famille des DASS (Divalent Anion Sodium Symporter) sont des symports qui permettent le déplacement de deux molécules à la fois, en fonction du gradient électrochimique. Ces transporteurs sont notamment connus pour l'échange entre le glutamate et le malate dans les chloroplastes.

- Les protéines de la famille PTR/NRT1 (« Peptide TRansporter /Nitrate Transporter 1 ») transportent les di- et tri-peptides.

- Les protéines de la famille OPT (« OligoPeptide Transporter ») transportent le glutathion, ainsi que les tétra- et penta-peptides.

- Les protéines de la famille ABC (« ATP Binding Cassette ») prennent en charge les peptides de plus grande taille.



**Figure 11 : voie de biosynthèse de l'asparagine.**

(a) Voie de biosynthèse de l'asparagine d'après Pratelli *et al.*, 2014. ASN : asparagine synthétase.

(b) Détails en quatre étapes de la synthèse d'asparagine à partir de glutamine et d'aspartate, d'après Gaufichon *et al.*, 2010. Les numéros entre crochets et « E » représentent respectivement l'ordre de la réaction et l'enzyme.

### c- Mise en réserves de l'azote

Après l'absorption et l'assimilation du nitrate en acides aminés, une partie de l'azote présent dans les racines est exporté dans la sève et parvient dans les organes aériens, où il est utilisé dans divers processus biologiques nécessaires à la croissance et/ou stocké dans les tissus. Chez certaines espèces, il existe des protéines spécialement dédiées à cette mise en réserve : ce sont des VSP (Vegetative Storage Proteins), ainsi que leur équivalent chez les ligneux, les BSP (Bark Storage Proteins). Ces réserves sont stockées dans les organes pérennes, dans les vacuoles des cellules du parenchyme des parties ligneuses, telles que la tige et les racines (Sauter and van Cleve, 1992; Gomez, 2002; Salaün *et al.*, 2005; Millard and Grelet, 2010), les taux accumulés étant très variables d'une espèce à l'autre (Meuriot *et al.*, 2004). Au-delà de leur capacité de stockage d'azote, certaines de ces protéines ont un rôle de défense chez le pêcher en permettant de lutter contre d'éventuelles attaques de pathogènes pendant la période hivernale où de nombreux processus cellulaires sont inactifs (Wisniewski *et al.*, 2004). Plusieurs facteurs de l'environnement peuvent influencer l'accumulation de ces protéines : la photopériode, la température, les brûlures et les blessures, le stress hydrique, ainsi que les perturbations des relations entre les organes sources et puits, comme au cours de la sénescence des feuilles ou suite à une coupe sévère (Mason and Mullet, 1990; Staswick, 1994; Avice *et al.*, 1996; Noquet *et al.*, 2001; Zhu and Coleman, 2001; Meuriot *et al.*, 2003; Wisniewski *et al.*, 2004). Il est également connu que des protéines solubles, notamment des VSP, s'accumulent dans la racine pivot chez la luzerne en réponse à une carence en nitrate d'ammonium, alors que ce sont du nitrate et des acides aminés (principalement de l'asparagine) en condition de confort (Meuriot *et al.*, 2003). Une étude menée chez le peuplier suggère que le promoteur du gène *bspA*, codant les protéines BSP, est stimulé par la glutamine et le nitrate d'ammonium, et de manière importante lorsque ces deux sources d'azote sont apportées simultanément à du saccharose dans le milieu de culture *in vitro* (Zhu and Coleman, 2001). Toujours chez le peuplier, les protéines BSP s'accumulent au voisinage du bourgeon apical au moment de sa formation (Lawrence *et al.*, 2001). À notre connaissance, aucune étude n'a pour l'heure établi de lien formel entre la mobilisation des protéines BSP (si elles existent chez le rosier), leur dégradation en acides aminés et l'alimentation en azote des axes II pendant les premières phases d'allongement après l'initiation du débourrement par décapitation (suppression d'un puits fort).

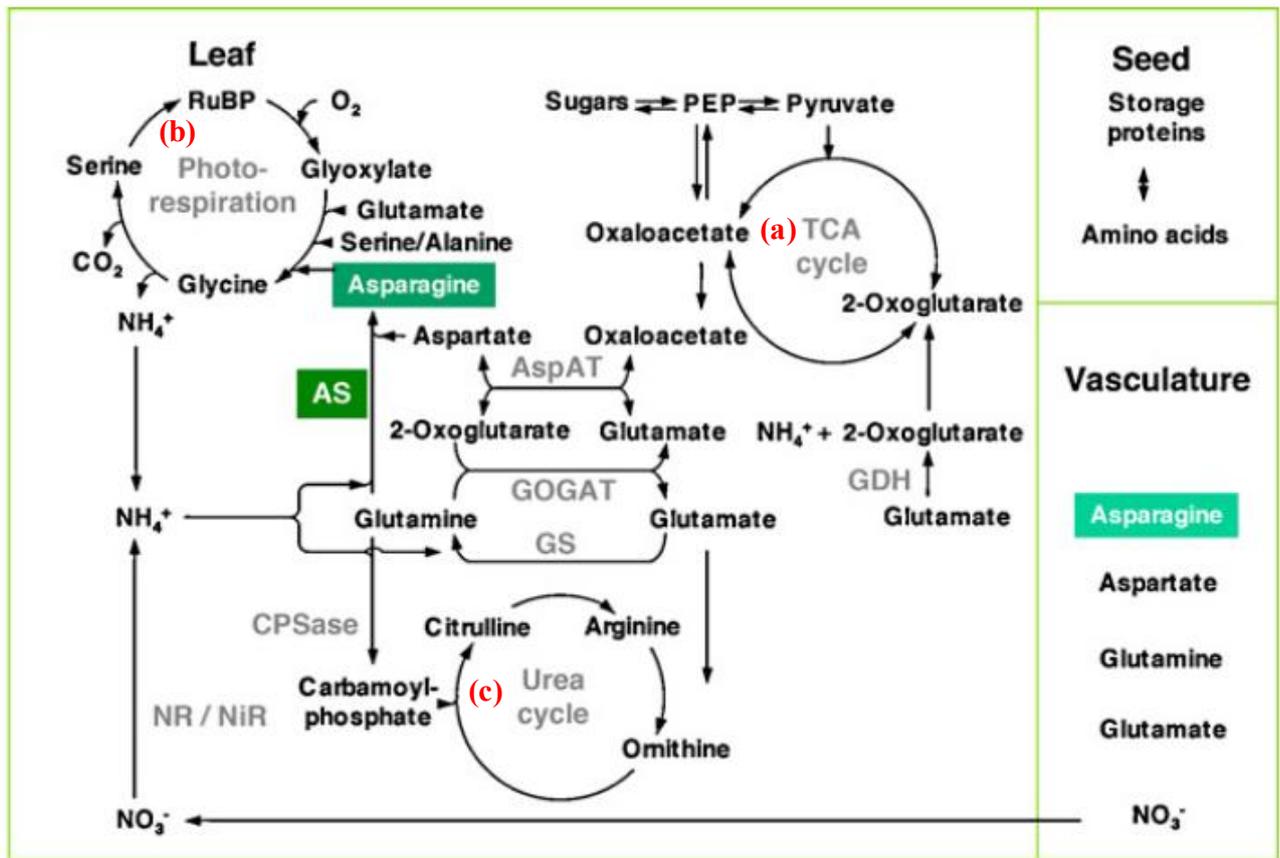


Figure 12 : principales voies d'assimilation de l'asparagine d'après Gaufichon *et al.* (2010).

(a) Cycle de Krebs.

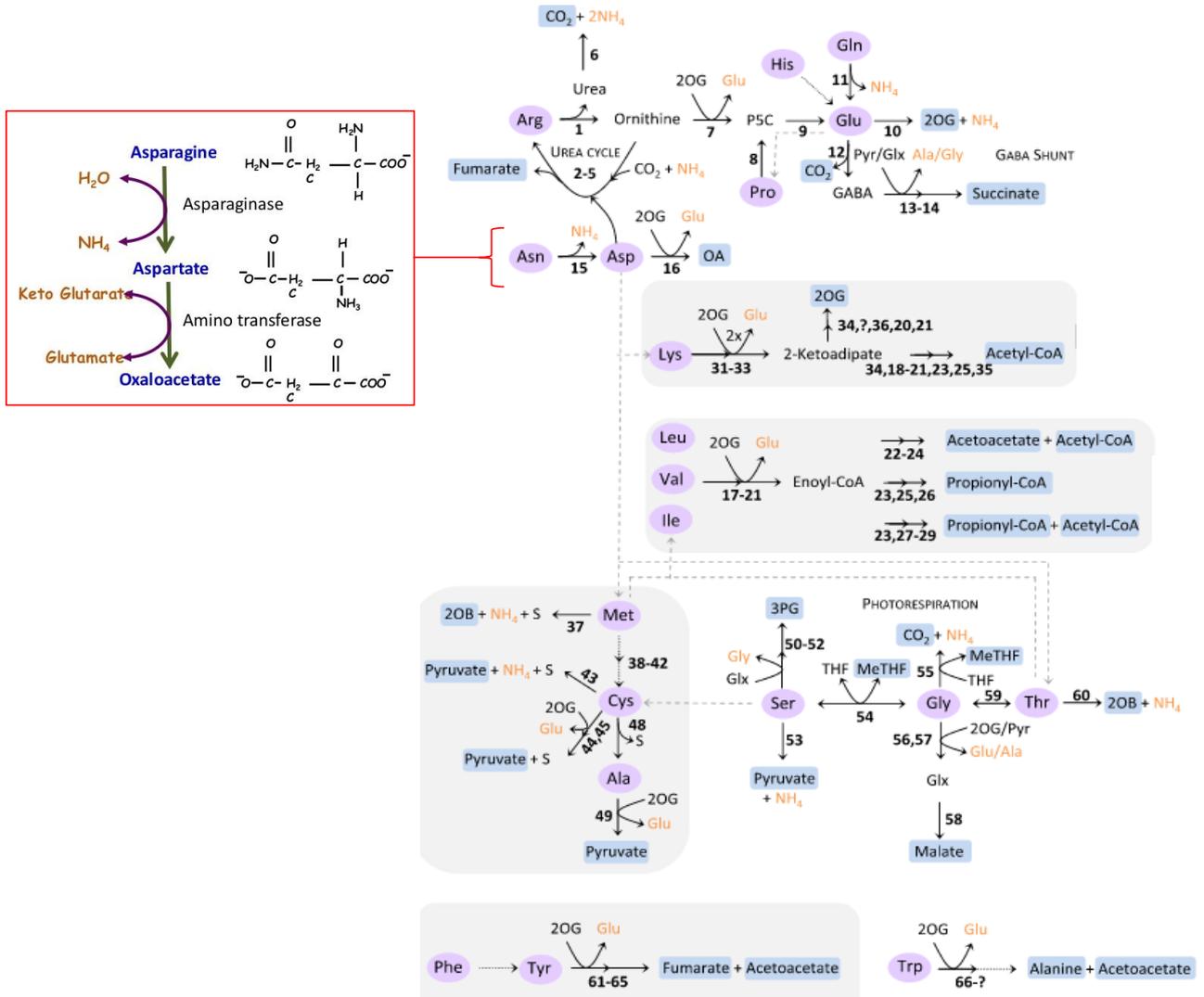
(b) Photorespiration.

(c) Cycle de l'urée.

AS : asparagine synthétase.

### 3- Origines de l'azote qui alimente les axes II en croissance

Au cours du cycle de vie des plantes, il arrive que l'absorption racinaire d'azote ne soit pas suffisante pour alimenter la croissance. Cela est notamment le cas lors de la reprise de croissance printanière, alors que la température basse du sol inhibe l'absorption d'azote (Dong *et al.*, 2001) et que la photosynthèse, alors faible ou inexistante, ne permet pas de produire les précurseurs carbonés nécessaires à la synthèse des acides aminés. Le débourrement des bourgeons nécessite alors l'utilisation d'azote disponible sous forme organique, préalablement stocké dans les tissus l'année précédente (acides aminés, protéines solubles, dont les VSP), pour la synthèse des molécules requises pour la croissance des nouveaux axes II. Chez les plantes pérennes, la capacité de mobilisation des réserves au printemps à destination des nouveaux organes, notamment des axes II, dépend de l'espèce et du stade de développement. En effet, la part d'azote mobilisable est généralement plus importante chez les sujets âgés, notamment en raison de l'augmentation de la capacité de stockage des organes-source et du tronc (Harrison *et al.*, 2000). Chez le chêne âgé de 50 ans par exemple, seuls 18 % de l'azote retrouvé dans les nouveaux axes en allongement 14 jours après le débourrement est issu de l'absorption (El Zein *et al.*, 2011). Chez les arbres à feuilles caduques comme le bouleau verruqueux, les parties ligneuses de la tige et des racines sont les principaux sites de stockage de l'azote et 37% à 48% de l'azote qui contribue à la croissance des nouveaux organes en sont issus chez des sujets âgés de 4 ans (Millard *et al.*, 1998, 2001). Chez le pommier, l'azote stocké dans la tige participe à hauteur de 18% à 87% dans la croissance printanière (Millard and Neilsen, 1989; Millard and Thomson, 1989; Neilsen *et al.*, 1997; Guak *et al.*, 2003), l'importance du stockage augmentant avec l'âge des individus : 18% à 54% pour les sujets de 2 ans (Millard and Neilsen, 1989) et 52% à 87% pour les sujets de 5 ans (Neilsen *et al.*, 1997). Chez le noyer, 54% de l'azote stocké dans la tige et les racines alimente les nouveaux organes (Frak, 2002). Chez des jeunes cerisiers de 2 ans, seul 14% à 26% de l'azote stocké l'année précédente contribue à la croissance (Grassi *et al.*, 2002), contre 80% à 100% chez des chênes d'un an (Vizoso *et al.*, 2008). Chez des *Nothofagus* de 5 ans, un genre de Fagacées dont les feuilles restent attachées aux branches durant l'hiver, 40% de l'azote stocké dans les racines est mobilisé pour la croissance des nouvelles feuilles et tiges (Stephens *et al.*, 2001), alors que les réserves sont plutôt mobilisées à partir des feuilles à hauteur de 15% chez le chêne vert (Cherbuy *et al.*, 2001). Chez les conifères, la stratégie est différente : l'azote est préférentiellement stocké dans les aiguilles pendant l'hiver. Chez l'épinette de Sitka et le pin sylvestre, 9% à 46% et 25% à 37% sont respectivement remobilisés au printemps (Millard and



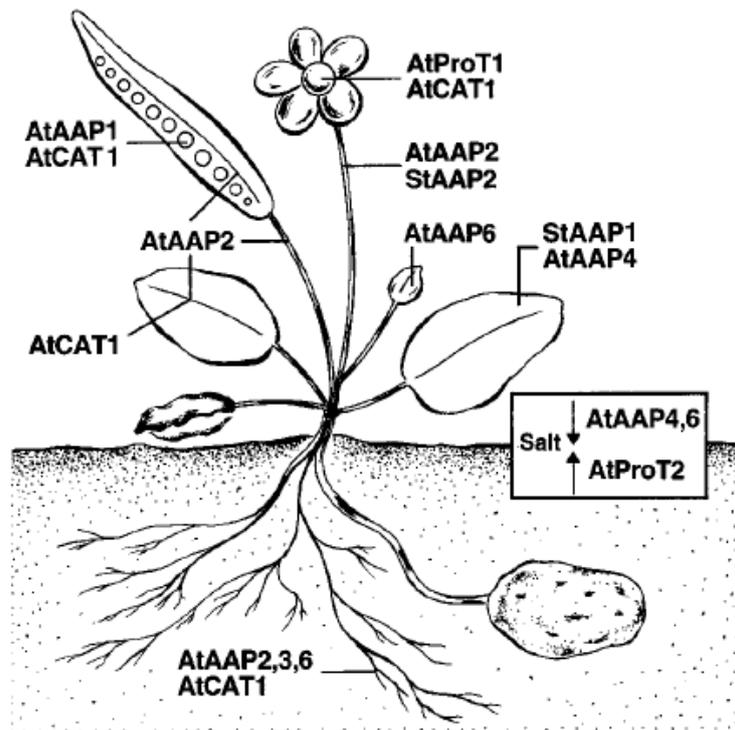
**Figure 13 : principales voies de dégradation de l'asparagine d'après Hildebrandt *et al.* (2015).**

La réaction n°15 est catalysée par l'asparaginase et la réaction n°16 par l'Aspartate AminoTransférerase (AspAT). OA : oxaloacétate.

Proe, 1993; Millard *et al.*, 2001). Chez les arbustes, les parties ligneuses de la tige et des racines sont les principaux sites de stockage de l'azote et mobilisent 15% à 48% pour la croissance chez le myrtillier (feuilles caduques), alors que 9% à 23 % des réserves d'azote sont issues des feuilles âgées chez l'airelle rouge (feuilles persistantes pendant l'hiver, Grelet *et al.*, 2001). La remobilisation des réserves d'azote contenues dans les racines vers des organes aériens en croissance survient également chez les plantes herbacées après une coupe sévère due à une récolte chez le brome mou et le trèfle (Phillips *et al.*, 1983), ou due à une défoliation chez le ray-grass et la luzerne (Ourry *et al.*, 1988; Avice *et al.*, 1996). De même, la suppression d'une partie de la biomasse aérienne en réponse à l'herbivorie (insectes ou mammifères) ou à un feu peut avoir des conséquences sur le cycle de l'azote à l'échelle d'une population de chênes (Ritchie *et al.*, 1998) ou d'une prairie de hautes herbes (Ojima *et al.*, 1994).

La capacité de mobilisation des réserves vers les axes II dépend également des conditions climatiques et des apports de l'année précédente. Un apport d'azote ou une défoliation à l'automne retarde la sénescence des feuilles et diminue leur capacité de remobilisation et de stockage pendant la période hivernale chez le pommier, le pêcher, le calamagrostis et la luzerne, ce qui limite la croissance au printemps suivant (Millard and Thomson, 1989; Tagliavini *et al.*, 1999; Gloser, 2005; Dhont, 2005). Les principales sources d'azote dans les feuilles se trouvent sous forme de protéines solubles telles que la RuBisCO (Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygénase) et les autres protéines impliquées dans la photosynthèse (plus de 80% des protéines solubles chez le pommier, Millard and Thomson, 1989). Globalement, plus les réserves en azote sont importantes, plus la croissance végétative survenant au printemps ou à la suite d'une coupe est conséquente (Millard and Neilsen, 1989; Avice *et al.*, 1996; Millard, 1996; Tagliavini *et al.*, 1998; Meuriot *et al.*, 2003, 2004; Dhont, 2005; Millard and Grelet, 2010). Millard and Thomson (1989) ont montré que des apports printaniers d'azote ne modifient pas le cycle interne de remobilisation chez le pommier, alors qu'un apport d'azote juste avant le débourrement améliore l'allongement des axes II chez le peuplier (Thitithanakul *et al.*, 2012; Thitithanakul, 2013).

Une étape de protéolyse est nécessaire à la mobilisation des réserves azotées quel que soit le contexte considéré tel que i) la sénescence, phénomène qui permet la mobilisation de l'azote des organes source et son transport vers les organes puits tels que les jeunes feuilles, les fruits (remplissage des grains) ou les organes non-photosynthétiques pérennes (mise en réserves), ou ii) lors de la mobilisation des réserves au printemps avant le débourrement. La



**Figure 14 : localisation des transporteurs d'acides aminés chez les plantes.**

AAP : Amino Acid Permease, CAT : Cationic Amino acid Transporter, ProT : Proline Transporter, At : *Arabidopsis thaliana*, St : *Solanum tuberosum* (Fischer *et al.*, 1998).

protéolyse a lieu dans la vacuole sous l'action de protéases (ou peptidases). Les exopeptidases clivent la région terminale de la chaîne polypeptidique et les endopeptidases clivent entre ces régions terminales. Les endopeptidases sont répertoriées en fonction de la nature de l'acide aminé du site catalytique : on parle de protéase à cystéine, protéase à sérine, protéase à thréonine, protéase à aspartate, etc. La protéolyse provoque une libération d'acides aminés et d'ammonium dans les cellules. L'ammonium est recyclé par l'intermédiaire du cycle GS/GOGAT pour limiter sa toxicité, tandis que les acides aminés sont chargés dans le phloème. Le transport à longue-distance des acides aminés dans le phloème peut être basipète et acropète pour allouer les réserves aux différents organes puits (Tromp and Ovaa, 1971) et réguler l'absorption de nitrate dans les racines (Muller and Touraine, 1992; Geßler *et al.*, 2004). Les concentrations en asparagine et en glutamine augmentent notamment dans le phloème au cours de la sénescence des feuilles (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008, 2010). Chez l'arabette et le colza, ce sont principalement le glutamate, l'aspartate, la glutamine et l'asparagine qui sont les acides aminés prédominants dans la sève phloémienne (Hunt *et al.*, 2010; Lohaus and Schwerdtfeger, 2014). L'asparagine et la glutamine sont les formes prédominantes chez le riz (Hayashi and Chino, 1990), tandis que l'asparagine et l'arginine sont retrouvées chez le pommier (Tromp and Ovaa, 1971, 1973).

Il est bien connu que la concentration en azote dans le xylème augmente d'environ 10 fois au cours du débourrement printanier (Millard *et al.*, 1998), principalement (95%) sous forme d'acides aminés (Guak *et al.*, 2003). Les plus abondants sont l'asparagine, l'arginine, l'aspartate et la glutamine chez le peuplier et plusieurs Rosacées telles que le pommier et le cerisier (Malaguti *et al.*, 2001; Grassi *et al.*, 2002; Guak *et al.*, 2003; Millard *et al.*, 2006), alors que la citruline est également abondante chez le noyer (Frak, 2002). Chez des troènes âgés d'un an, la glutamine est la principale forme de transport d'azote dans le xylème au cours du débournement printanier, alors que l'arginine est l'acide aminé majoritaire lorsque la disponibilité en carbone est faible en raison d'apports en azote limitants dans les racines (Guérin *et al.*, 2007). Ainsi, les acides aminés qui alimentent les axes II au cours du débournement peuvent avoir deux origines (absorption courante ou mobilisation des réserves), dans une proportion qui reste à définir chez de jeunes rosiers.



#### 4- Effets de l'azote sur le statut des régulateurs de croissance

##### a- Implication des formes minérales d'azote sur le statut des régulateurs de croissance au cours du débourrement

**L'auxine.** Chez l'arabette, une carence en nitrate conduit à une augmentation du flux d'auxine dans la tige et inhibe le débourrement des bourgeons basaux (de Jong *et al.*, 2014a). Chez des pins de Monterey âgés de deux ans, une carence en azote favorise la dominance apicale (ou le débourrement d'un seul bourgeon axillaire lorsque l'apex est supprimé) et est sans effet sur la taille globale de la plante (Will, 1971). En revanche, une forte fertilisation chez de jeunes sujets aboutit à une réduction de la dominance apicale en stimulant le développement de plusieurs axes II (Will, 1971). À une échelle d'étude plus fine, il a été montré au cours du tallage chez le riz qu'un fort apport de nitrate d'ammonium dans l'environnement racinaire induit une réduction de la dominance apicale au travers de la surexpression dans les bourgeons du gène codant le *miRNA393* (Li *et al.*, 2016). La mutation de ce gène provoque le même phénotype que chez le sauvage soumis à une carence en azote, soit une réduction du tallage, ses effets ne pouvant être compensés par un apport d'azote. Les auteurs ont démontré que ce petit ARN inhibe le niveau d'accumulation des transcrits des gènes impliqués dans la synthèse d'auxine et sa signalisation (*OsTIR1*, *OsAFB2* et *OsIAA6*), ainsi que de l'homologue de BRC1 chez le riz (*OsTBI*). Ainsi, l'azote est capable de réduire la sensibilité des bourgeons à la dominance apicale (Xia *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2016b). Chez l'arabette, le niveau d'expression du gène *BRC1* est sous la dépendance des teneurs en auxine dans la tige. Les auteurs ont démontré que le double mutant *brc1-2 brc2-1* présente un nombre de ramifications plus élevé que chez le sauvage mais une faible disponibilité en nitrate amoindri cet effet (Seale *et al.*, 2017).

**Les cytokinines.** Dans des feuilles de maïs détachées de l'ensemble de la plante, le niveau d'accumulation des transcrits des gènes codant des régulateurs de réponse de la signalisation par les cytokinines (*ZmCip1* et *ZmRR1*) est stimulé par un apport de cytokinines et pas par un apport de nitrate (Sakakibara *et al.*, 1998). Cette induction ne survient que lorsque le nitrate est apporté dans les racines (Sakakibara *et al.*, 1998). L'augmentation des teneurs en cytokinines dans les feuilles de maïs survient dès 4 heures après l'apport racinaire de nitrate et perdure pendant au moins 24 heures (Takei *et al.*, 2001). Chez l'arabette, un apport de cytokinines par aspersion sur les feuilles induit l'expression des gènes codant des régulateurs de réponse de type A de la signalisation par les cytokinines *ARR3* à *ARR7* (Taniguchi *et al.*,



1998), au même titre que le nitrate dans les racines. Ces résultats suggèrent que le nitrate, proposé comme métabolite signal (Crawford, 1995; Forde, 2002a,b), induit la biosynthèse des cytokinines dans les racines et leur transport à longue distance vers les parties aériennes pour y stimuler la croissance (Takei *et al.*, 2002a). Cette synthèse se réalise au travers de l'expression des gènes *IPT* (Takei *et al.*, 2004a), ainsi que *CYP735A1* et *CYP735A2* (cytochrome P450 monooxygénases, Takei *et al.*, 2004b). Le gène *IPT3* est stimulé dans les racines dans l'heure qui suit un apport de nitrate chez l'arabette (Miyawaki *et al.*, 2004). De plus, l'équipe d'Argyros (2008) a démontré que la majorité des gènes régulés par les cytokinines est sous la dépendance de régulateurs de réponse de type B (*ARR1*, *ARR10*, et *ARR12*, Figure 8). Chez le triple mutant *arr1-3 arr10-5 arr12-1* d'arabette, la sensibilité aux cytokinines est réduite, notamment au travers de la répression des ARR de type A (*ARR5*, *ARR7* et *ARR15*), du gène de dégradation (*CKX4*) et de perception (*AHK4*) des cytokinines. Contrairement aux gènes codant des ARR de type A (*ARR3* et *ARR4*), les gènes codant des ARR de type B (*ARR1*, *ARR2* et *ARR10*) ne sont pas sensibles à un apport de nitrate après une période de carence dans les feuilles chez l'arabette (Kiba *et al.*, 1999).

La synthèse des cytokinines dans les racines et la signalisation à longue distance associée n'est pas sous la dépendance exclusive du nitrate (Takei *et al.*, 2002), des molécules issues de son assimilation (ammonium, acides aminés) peuvent également avoir des effets sur le métabolisme des cytokinines. Le nitrate induit chez l'arabette une augmentation des teneurs en cytokinines au travers de l'expression du gène *ARR5* dans les feuilles, contrairement à l'ammonium qui, de surcroît, inhibe la croissance de l'ensemble de la plante et dont les effets négatifs peuvent être compensés par un apport de *trans*-zeatin (Shtratnikova *et al.*, 2015). Chez la tomate, une trop forte concentration d'ammonium dans la solution nutritive réduit la concentration en cytokinines dans le xylème (Lu *et al.*, 2009). Chez le riz, le niveau d'accumulation des gènes *IPT4/5/7/8* est stimulé en réponse à des apports racinaires de nitrate ou d'ammonium appliqués de manière exogène et s'accompagne d'une augmentation des teneurs en cytokinines (Kamada-Nobusada *et al.*, 2013). Cette induction est réprimée par un ajout de L-méthionine sulfoximine, un inhibiteur potentiel de l'activité de la glutamine synthétase. La glutamine, qui est l'acide majoritaire dans les racines chez le riz, rétablit l'induction de ces gènes. La stimulation de l'accumulation des transcrits du gène *IPT3* est également dépendant de la présence de glutamine chez l'arabette (Kamada-Nobusada *et al.*, 2013).



Il a été démontré chez le riz et le rosier que les cytokinines impliquées dans le débourrement sont produites principalement dans la tige au voisinage des bourgeons après la levée de dominance apicale (Tanka *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2015; Roman *et al.*, 2016). Ce résultat est appuyé par le fait que les bourgeons sont capables de débourrer le long de l'axe I décapité chez des rosiers dont le système racinaire a été éliminé et dont la base de la tige baigne dans de l'eau qui ne contient que des traces d'azote (J. Lothier, non-publié). De plus, il a été montré chez le rosier que le niveau d'accumulation des transcrits du gène *IPT3* augmente transitoirement dans la tige et pas dans les racines, dès 6 heures après l'initiation du débourrement par décapitation de l'apex (résultats préliminaires, N. El Atba, 2013, stage dans l'équipe Arch-E). Cette augmentation survient dans le sommet de la tige (5 fois), de manière bien moins marquée (2 fois) chez les plantes dont la solution nutritive est dépourvue en nitrate à partir de la décapitation. À la base de la tige en revanche, la faible disponibilité en nitrate retarde la stimulation de l'expression du gène *IPT3*, qui atteint le même niveau que chez les plantes sont carencées 24 heures après la décapitation (3 fois, résultats préliminaires, N. El Atba, 2013, stage dans l'équipe Arch-E). Chez le riz, la glutamine est l'acide aminé majoritaire dans les tissus (Kamada-Nobusada *et al.*, 2013). L'augmentation des teneurs en cytokinines dans la tige en réponse à la glutamine contribue à la stimulation de l'allongement des talles issus du débourrement des bourgeons, au même titre qu'un apport de cytokinines de synthèse (Kamada-Nobusada *et al.*, 2013). Or, le débourrement est inhibé lorsque le gène codant la glutamine synthétase 1.2 (*GSI.2*) est éteint au voisinage des bourgeons axillaires chez le riz (Ohashi *et al.*, 2015, 2017). Une étude récente a démontré que la glutamine, ou un métabolite proche, est nécessaire pour la synthèse de cytokinines dans le bourgeon chez le riz (Ohashi *et al.*, 2017). Cette enzyme est impliquée dans la croissance en condition non-limitante de nitrate et la régulation des teneurs en ammonium chez l'arabette (Lothier *et al.*, 2011).

**Les strigolactones.** Chez le riz, l'apport d'un analogue de synthèse de cytokinines (BAP) ou de nitrate d'ammonium régule la signalisation par les strigolactones au travers de la réduction du niveau d'accumulation des transcrits des gènes impliqués dans leur synthèse (*OsD10/17/27*) dans les racines, l'entre-nœud et le bourgeon, dès 3 heures après le traitement (Xu *et al.*, 2015). Une carence en nitrate réduit la croissance des axes II chez le pétunia, le phénotype étant plus marqué chez les mutants *ccd8* et *dad2*, respectivement déficients au niveau de la voie de biosynthèse et de signalisation par les strigolactones (Drummond *et al.*, 2015). De même, chez l'arabette, le nombre d'axes II secondaires produit chez les simples



mutants *max1-1* (déficient en SL) et *axr1-3* (résistant à l'auxine) augmente comparativement au sauvage en condition de confort, alors que cet effet est limité lorsque les plantes sont carencées. La réduction de la taille globale des plantes et du nombre d'axes II peut être compensé par un apport d'ammonium ce qui suggère que c'est le statut en azote qui prévaut et non l'aspect d'acteur de signalisation du nitrate (de Jong *et al.*, 2014a). Les plantes sont plus petites et près de deux fois plus ramifiées chez le double mutant *max1-1-axr1-3* par rapport au sauvage, sans que la concentration en nitrate dans l'environnement racinaire ne joue de rôle. Ainsi, la capacité à réduire le débourrement en réponse à une carence de nitrate est dépendante de la présence d'auxine et de strigolactones (de Jong *et al.*, 2014a).

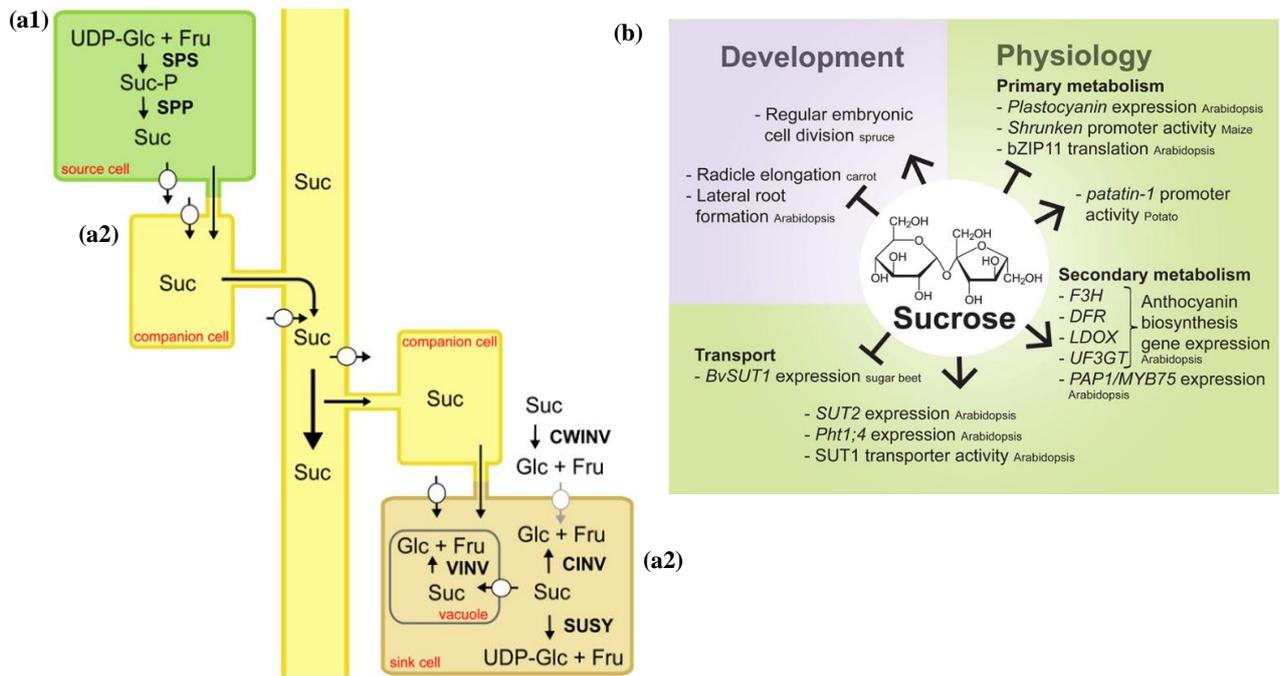
#### b- Autres molécules azotées impliquées dans le débourrement

**Les peptides.** Ce sont des polymères d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques. Il en existe une énorme variété, certains d'entre eux, codés par les familles de gènes *CLE* (*CLAVATA3 / EMBRYO SURROUNDING REGION*) et *CEP* (C-terminally Encoded Peptide) sont connus pour leur rôle dans la communication à courte distance entre cellules et à longue distance entre les racines et les organes aériens (Okamoto *et al.*, 2016; Ohkubo *et al.*, 2017). Sept peptides CEP sont ainsi dix fois plus produits dans les racines en réponse à une carence en azote, et sont chargés probablement passivement dans le xylème en direction des parties aériennes pour y exercer leurs régulations (reviewé par Okamoto *et al.*, 2016). De plus, l'équipe de Yaginuma *et al.*, (2011) a démontré chez l'arabette l'implication du peptide CLE42 dans l'initiation de la formation des méristèmes axillaires et la stimulation du débourrement. La surexpression du gène codant ce peptide, ou son apport exogène aboutit à des phénotypes buissonnants, la ramification étant stimulée même pendant la croissance végétative. Plus récemment, le peptide CLE48 a été identifié comme une cible de l'auxine au cours du développement du méristème apical (Guo *et al.*, 2015).

**Les espèces réactives de l'azote et de l'oxygène.** Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule-signal impliquée dans de nombreux aspects du développement des plantes. Cette molécule diffuse rapidement dans toute la plante en tant que signal qui est émis en réponse à des *stimuli* environnementaux de nature biotique et/ou abiotique (Planchet and Kaiser, 2006). Le NO est connu pour être au moins en partie produit par la nitrate réductase chez la chlorophycée *Chlamydomonas reinhardtii* (Sakihama *et al.*, 2002), le soja (Dean and Harper, 1988), le riz (Sun *et al.*, 2015), l'épinard, le tournesol et le maïs (Rockel *et al.*, 2002). La croissance végétative est inhibée chez des plantules de riz soumises à une forte concentration



de nitroprussiate de sodium (SNP), un donneur de NO (Ou *et al.*, 2015). Chez l'arabette, une forte teneur en NO dans les racines induit une baisse des teneurs du transporteur d'auxine PIN1 qui aboutit à l'inhibition de la croissance et de l'activité du méristème apical racinaire (Fernandez-Marcos *et al.*, 2011). Le NO est également capable de modifier le statut épigénétique de gènes impliqués dans le développement chez le riz et intervient dans l'établissement d'une mémoire épigénétique trans-générationnelle lorsqu'il est présent en trop grande quantité dans le milieu de culture, rendant les descendants plus résistants à ce type de stress (Ou *et al.*, 2015). Le NO est également impliqué dans l'initiation de la floraison chez des mutants déficients pour l'activité de la nitrate réductase (Seligman *et al.*, 2008), le phénomène de l'initiation de la floraison étant relativement proche de celui du débourrement. Ainsi, le NO pourrait constituer un bon candidat pour agir en tant que signal en provenance des racines en réponse à une faible disponibilité en nitrate et à destination des bourgeons. Au cours des dernières années, l'expression « espèces réactives de l'azote » (RNS pour Reactive Nitrogen Species) a été introduite dans la littérature pour désigner le NO et d'autres molécules liées au NO, telles que les S-nitrosothiols (RSNO), le S-nitrosogluthation (GSNO) et le peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>). Les espèces réactives de l'azote dérivent du NO et du superoxyde (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>) produits par la NOS2 (Nitric Oxide Synthase 2) et la NADPH oxydase respectivement dans les peroxyosomes. Les RNS sont des produits toxiques du métabolisme pouvant altérer les constituants lipidiques et protéiques, ainsi que l'ADN. Ce sont également des acteurs importants de la signalisation cellulaire en régulant le niveau d'expression de gènes impliqués dans les réponses aux basses et fortes températures, aux fortes intensités lumineuses et aux blessures chez le pois (Corpas *et al.*, 2008). Il a été montré que la forme active des cytokinines, la trans-zéatine, est capable de réagir chimiquement *in vitro* avec un dérivé du NO, le peroxy-nitrite, pour réduire les teneurs en espèces réactives de l'azote et donc le stress nitrosatif (Liu *et al.*, 2013; Sanz *et al.*, 2015). Le glutathion est un tripeptide cytoplasmique, formé par la condensation de glutamate, de cystéine et de glycine, qui intervient dans le maintien du potentiel redox du cytoplasme des cellules et dans un certain nombre de réactions de détoxification et d'élimination d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour Reactive Oxygen Species) et de l'azote. L'implication du glutathion dans la transduction des signaux en condition de confort et de différentes situations de stress a fait l'objet d'un article de revue par l'équipe de Noctor *et al.* (2012). La concentration en glutathion diminue au cours du débourrement, induit par le thidiazuron (forme de cytokinines de type phénylurée), chez le pommier (Wang *et al.*, 1991). Chez la vigne, l'activité de la catalase, impliquée dans la dismutation du peroxyde d'hydrogène, diminue de moitié dans les bourgeons endodormants



**Figure 15 : métabolisme et effets signalétiques du saccharose.**

Synthèse du saccharose (Suc) dans les organes photosynthétiques à partir du glucose (UDP-Glc) et du fructose (Fru) par la saccharose phosphate synthase (SPS) et la saccharose phosphate phosphatase (SPP).

**(a1)** Chargement du saccharose dans les cellules compagnes (phloème) par voie apoplasmique ou symplasmique.

**(a2)** La force puits des organes en croissance entraîne le saccharose qui se déverse dans les cellules compagnes à leur voisinage, à nouveau par voie apoplasmique ou symplasmique.

**(a3)** Le saccharose peut être clivé en sucres simples (Glc et Fru) par des invertases pariétales (CWINV), cytoplasmiques (CINV, ou par des sucrose synthétases : SUSY), ou vacuolaires (VINV).

Dans le cadre de ces travaux, le gène *RhSUC2*, codant un transporteur membranaire de saccharose impliqué dans le débourrement (Henry *et al.*, 2011)

**(b)** Effet de la signalisation par le saccharose (sucrose) à la fois sur le développement et la physiologie des plantes.

Figure tirée de Wind *et al.* (2010).

après induction chimique (cyanamide hydrogène) du débourrement (Nir *et al.*, 1986). La même observation a été réalisée chez la vigne (Halaly *et al.*, 2008). Chez le porier japonais (nashi), le peroxyde d'hydrogène est fortement concentré dans les tissus en décembre, au moment de la levée de l'endodormance. En revanche, les teneurs sont faibles si les sujets ne sont pas soumis à une période de froid, ce qui inhibe le débourrement printannier des bourgeons (Kudora *et al.*, 2002). Ainsi, il apparaît envisageable que les RNS et les ROS puissent contribuer au contrôle du débourrement en perturbant le métabolisme oxydatif des tissus.

#### **IV° Régulation du débourrement et de l'allongement des axes II par les sucres**

##### **1-Le métabolisme des sucres**

###### **a- Rôle nutritif et origines des sucres au cours de l'allongement des axes II**

Les bourgeons sont des organes dormants qui deviennent des organes-puits après la perception des signaux induisant leur débourrement. Les sucres constituent une source importante d'énergie et de carbone dans toutes les cellules eucaryotes. C'est pourquoi, le débourrement s'accompagne de variations des concentrations de sucres dans le bourgeon, notamment chez le pêcher (Maurel *et al.*, 2004), l'euphorbe (Chao *et al.*, 2006), le noyer (Decourteix *et al.*, 2008; Bonhomme *et al.*, 2009) et le rosier (Henry *et al.*, 2011). Ces variations résultent de deux types de gènes majeurs du métabolisme des sucres, dont le niveau d'accumulation des transcrits augmente dans les bourgeons au cours du débourrement : les invertases et les transporteurs de sucres.

- La surexpression du gène *RhVII* (*Rosa hybrida Vacuolar Invertase 1*, Girault *et al.*, 2010) permet la synthèse d'une enzyme qui catalyse l'hydrolyse du saccharose en fructose et glucose (Figure 15a). Ces sucres simples permettent d'alimenter en carbone et en énergie les réactions moléculaires, de maintenir la pression osmotique et d'induire la force puits (gradient de concentration en sucres entre les sites de chargement et de déchargement du phloème) nécessaires à l'allongement. Ce phénomène est similaire dans les racines d'arabette en croissance (Tang *et al.*, 1999; Sergeeva *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010a). Chez le bambou et le rosier, les teneurs en cytokinines sont corrélées au niveau d'expression du gène de l'invertase vacuolaire ainsi qu'à l'activité invertasique dans les bourgeons qui débourrent, leur permettant ainsi d'augmenter leur force puits (Roitsch and Ehneß, 2000; Rabot *et al.*, 2012; Liao *et al.*, 2013). La dégradation du saccharose en sucres simples peut également être la



conséquence de l'augmentation de la transcription du gène et de l'activité de la SUSY (Sucrose Synthase), comme cela a été montré dans les bourgeons de vigne après induction chimique du débourrement au cyanamide hydrogène (Keilin *et al.*, 2007; Halaly *et al.*, 2008).

- Le débourrement s'accompagne d'une augmentation de la concentration de saccharose dans la sève xylémienne, où est induit le gène *SUT1* (SUT : Sucrose Transporter, ou SUC : SUCrose Carrier, ou SUF : SUCrose Facilitator) qui code chez le noisetier un transporteur de saccharose (Decourteix *et al.*, 2008). Il existe également chez ce végétal une corrélation entre la capacité d'allongement des axes II et un influx de saccharose dans la sève (Bonhomme *et al.*, 2009). Ces mouvements de sucres à longue distance d'un organe à un autre nécessitent un transport dans les vaisseaux conducteurs de sève. Le saccharose est déchargé dans le phloème selon la voie symplastique (plasmodesmes) et/ou selon la voie apoplastique (co-transporteurs protons-saccharose). Chez le tubercule de pomme de terre, des connexions symplasmiques permettent l'importation du saccharose et de l'amidon dans les bourgeons, produisant les parties aériennes de la plante (Viola *et al.*, 2007). Plusieurs familles de transporteurs de saccharose ont été identifiés, notamment le transporteur *RhSUC2* (*Rosa hybrida* SUCrose transporter 2), responsable de l'importation active de saccharose dans les bourgeons chez le rosier (Henry *et al.*, 2011). Les SWEET sont des transporteurs de sucres, en particulier de glucose, qui n'appartiennent pas à la Superfamille des Facilitateurs Majeurs (MFS : Major Facilitator Superfamily) et qui ont été identifiés en réponse à une attaque de pathogènes (Chen *et al.*, 2010). Ils sont impliqués dans le chargement du phloème et la formation des parois des cellules du xylème (Chen *et al.*, 2012, 2015; Le Hir *et al.*, 2015; Eom *et al.*, 2015). Le gène *RhSWEET10*, codant un transporteur de saccharose, est stimulé dans la tige et le bourgeon à la lumière et à l'obscurité par un apport de cytokinines de synthèse, permettant d'augmenter la force puits des axes II en croissance chez le rosier (Roman *et al.*, 2016).

#### b- Origines des sucres qui alimentent les axes II en carbone

Le carbone qui alimente les axes II en croissance peut lui aussi avoir deux origines.

- Il peut être issu de l'activité photosynthétique courante, par fixation et réduction du CO<sub>2</sub> atmosphérique. L'équipe de Kebrom and Mullet (2015) a démontré que des variations de la surface foliaire et de la photosynthèse régulent la croissance des axes II chez le sorgho.

- Il peut également provenir des réserves produites avant la décapitation et stockées dans les tissus, comme démontré notamment chez le chêne et le mélèze (Cherbuy *et al.*, 2001;



Kagawa *et al.*, 2006). Chez l'ivraie, le méristème apical caulinaire est alimenté en majorité par du carbone stocké dans les vacuoles des autres organes avant le débourrement, et secondairement, à hauteur d'environ 25% par du CO<sub>2</sub> nouvellement assimilé par la jeune tige feuillée dont il est à l'aisselle (Rye, 1972). Les sucres peuvent être stockés momentanément dans les plastes (Wind *et al.*, 2010), notamment sous forme d'amidon, sucre composé de chaînes de glucose. Chez l'arabette, seul l'ammonium, et pas le nitrate, est capable de stimuler la mobilisation de l'amidon (Wang *et al.*, 2004). La mobilisation et l'hydrolyse de l'amidon sont des mécanismes impliqués dans la reprise de croissance des ligneux à la sortie de l'hiver, chez le pin à l'encens et le peuplier faux-tremble (Ludovici *et al.*, 2002; Landhäusser and Lieffers, 2003). L'amidon est hydrolysé au cours du débourrement chez le frêne (Cottignies, 1985) et le bouleau (Rinne *et al.*, 1994). La concentration de saccharose diminue dans les bourgeons de pêcher au cours de leur débourrement, au détriment des concentrations en stachyose, raffinose, et fructose (Marquat *et al.*, 1999). Chez des troènes âgés d'un an, du stachyose, du mannose et du saccharose sont présents dans le xylème au cours du débourrement printanier. Ces sucres sont issus de la mobilisation des réserves en carbone et leurs concentrations sont plus importantes lorsque l'apport en azote est faible (Guérin *et al.*, 2007). Chez le rosier, les concentrations en saccharose, en glucose et en amidon diminuent pendant les deux jours qui suivent l'initiation du débourrement chez le rosier, puis les concentrations en saccharose et en glucose augmentent alors que celle de l'amidon continue de chuter. Cela suggère que les sucres importés par les bourgeons peu après la décapitation proviennent de réserves mobilisées dans la région de la tige immédiatement adjacente (Girault *et al.*, 2010).

## 2- La signalisation par les sucres au cours du débourrement

### a – Perception du signal

Indépendamment de leur rôle trophique, les sucres constituent des signaux capables de réguler divers processus durant le cycle de vie de la plante (Figure 15b). Il existe plusieurs voies de perception extra-cellulaire. i) La voie de signalisation faisant appel à des hexokinases dans la perception et la transduction du signal porté par le glucose a été révélée par l'utilisation d'analogues de glucose non-métabolisables (2-deoxyglucose), phosphorylé par ces kinases (Jang *et al.*, 1997). La surexpression du gène codant l'hexokinase HXK1, un récepteur du signal transmis par les sucres, engendre une augmentation du nombre d'axes II issus du débourrement des bourgeons de la rosette chez l'arabette (Barbier *et al.*, 2015a). De



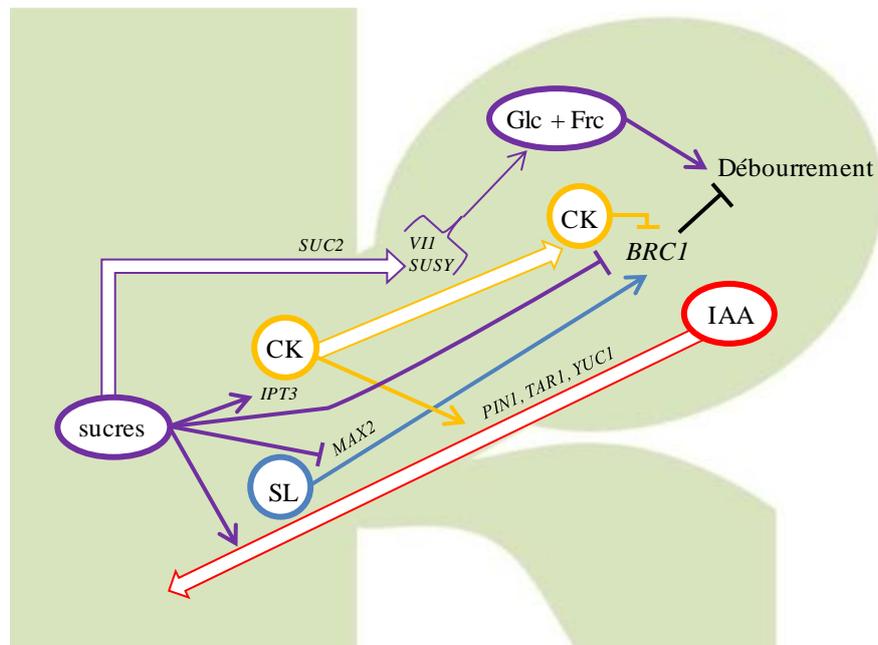
plus, cette voie a été établie comme commune à la signalisation par les cytokinines, la lumière et les nutriments, au travers de l'étude du mutant *gin2* (*glucose insensitive 2*, Moore *et al.*, 2003). ii) Le niveau d'accumulation des transcrits des gènes codant notamment l'asparagine synthase 1 (Xiao *et al.*, 2000) et le transporteur de nitrate 2.1 (de Jong *et al.*, 2014b) présente la même sensibilité au glucose chez le mutant *gin2* par rapport au sauvage, suggérant que la régulation de ces gènes par le glucose passe par une voie indépendante de celle de l'hexokinase.

#### b- Transduction du signal

Les connaissances sur le mode de transduction du signal associé aux sucres sont encore partielles. Ils pourraient être impliqués dans la régulation des protéines kinases SnRK1 (SnF1-Related Protein Kinase) et TOR (Target Of Rapamycin), qui se répriment mutuellement. Ces protéines coordonnent les adaptations cellulaires aux changements nutritionnels et énergétiques, au travers de cascades de phosphorylation agissant sur l'expression des gènes par l'intermédiaire de facteurs de transcription spécifiques, dont les facteurs bZIP (Mair *et al.*, 2015). Ce complexe protéique inhibe le métabolisme et la croissance, en régulant notamment la synthèse protéique, le métabolisme des glucides (phosphorylation de la saccharose phosphate synthase), la synthèse des acides gras (phosphorylation de l'acétyl-CoA carboxylase) et l'assimilation de l'azote chez les végétaux (phosphorylation de la nitrate réductase, Sugden *et al.*, 1999; Robaglia *et al.*, 2012). Ces mécanismes font intervenir l'ATP, qui est utilisé comme source d'énergie dans la plupart des processus cellulaires très consommateurs d'énergie (réplication de l'ADN, divisions cellulaires, biosynthèse des protéines, *etc.*). Or, les teneurs en ATP sont connues pour augmenter après la levée de dominance apicale chez le fraisier (Robert *et al.*, 1997).

#### c- Le rôle signal des sucres au cours du débourrement

Il est désormais acquis que les sucres possèdent une double fonction de métabolites-signal et seraient des acteurs majeurs de la levée de dormance des bourgeons (Van den Ende, 2014; Yuan *et al.*, 2015; Rameau *et al.*, 2015; Teichmann and Muhr, 2015; Barbier *et al.*, 2015a; Evers, 2015). Plusieurs études ont démontré que l'implication de la composante signalétique du saccharose dans le débourrement des bourgeons permettrait de passer outre la dominance apicale. En effet, les résultats indiquent qu'un apport d'auxine dans une goutte de lanoline à l'extrémité d'une tige décapitée n'inhibe pas toujours le débourrement chez de nombreuses



**Figure 16 : intégration des rôles des sucres dans le débourrement.**

*BRC1* : facteur de transcription *BRANCHED1*, CK : cytokinin, IAA auxine (Indole-3-Acétic Acid), PIN1 : PIN-FORMED1, SL : strigolactones. Les flèches épaisses représentent les flux de molécules: violet pour les sucres (saccharose, Glc : glucose, Frc : fructose), rouge pour l'auxine (IAA) et jaune pour les cytokinines. Les flèches et les arrêts en gras représentent les effets signalétiques des différentes molécules, dont les strigolactones en bleu.

Figure adapté des travaux de Girault *et al.*, 2009, 2010, Barbier *et al.*, 2015b.

espèces, alors que la levée de dominance apicale par décapitation ou application d'inhibiteur de transport de l'auxine (TIBA, acide 2,3,5-triiodobenzoïque) n'induit pas systématiquement le débourrement (Cline, 1996; Morris, 2005; Ferguson and Beveridge, 2009). Le flux basipète d'auxine n'est pas assez rapide pour expliquer le comportement des bourgeons qui sont situés à une distance importante de la source de production. Il a été montré chez le pois et le rosier que les sucres pourraient agir avant que les tissus ne perçoivent la baisse de concentration d'auxine (Barbier *et al.*, 2015a; Barbier *et al.*, 2015b; Mason *et al.*, 2014). Ces résultats ont été en partie obtenus à l'aide d'analogues non-métabolisables de saccharose (palatinose, lactulose, turanose, mélibiose), de fructose (psicose) et de glucose (L-glucose, 2-deoxyglucose, 3-O-méthylglucose), qui ont été capables d'initier le débourrement et un faible allongement des axes II (absence de fait de composante nutritionnelle), et de modifier l'expression de certains gènes. Chez le rosier, le saccharose engendre une baisse d'accumulation des transcrits des gènes inhibiteurs du débourrement (*MAX2* et *BRC1*), ainsi qu'une augmentation de ceux stimulant la biosynthèse des cytokinines dans la tige (*IPT3*) et la biosynthèse d'auxine dans le bourgeon et son exportation (*YUC1*, *TAR1* et *PINI*). Ces variations promeuvent le débourrement (Barbier *et al.*, 2015a). Les interactions entre les sucres et les régulateurs de croissance sont présentées en Figure 16.

### **V° Implication d'une composante épigénétique dans le débourrement**

Les bourgeons sont des organes passifs qui s'activent en réponse à des variations des conditions environnementales. L'épigénétique regroupe un ensemble de phénomènes modifiant l'ADN de manière plus ou moins stable, éventuellement héritable, qui ne sont pas liés à un changement de la séquence de base de l'ADN. Ces « marques », qui s'établissent en particulier sous l'influence de facteurs de l'environnement conditionnent la capacité de l'ADN à être transcrit.

L'expression des gènes est soumise à une régulation fine, permettant des réponses rapides et adaptées. L'ADN est une suite de gènes et de séquences intergéniques. Ces gènes s'expriment lorsqu'ils sont accessibles aux facteurs de transcription, c'est-à-dire quand la chromatine est décondensée à leur locus. Plusieurs marques épigénétiques régulent l'organisation de la chromatine : l'acétylation et la méthylation des histones, la méthylation de l'ADN, les miARN, *etc.* Généralement, un gène est exprimé quand les cytosines de la séquence promotrice sont déméthylées et que certaines lysines de la queue des histones à son locus sont hypométhylées et hyperacétylées.



**Méthylation de l'ADN.** La méthylation du cinquième carbone des cytosines de l'ADN constitue une marque épigénétique bien documentée dans la littérature et simple à étudier. L'ADN Méthyltransférase MET1 est fortement impliquée dans le développement des plantes puisqu'elle est responsable de la méthylation de novo et du maintien de l'état de méthylation des sites CG de l'ADN (Furner and Matzke, 2011). Son activité est essentielle puisque le taux de méthylation de l'ADN génomique varie selon l'âge de la plante (Messeguer *et al.*, 1991; Fraga *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2008) et les organes considérés (Ruiz-García *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011). Le taux de méthylation de l'ADN est également très variable d'une espèce à l'autre (Causevic *et al.*, 2005; Cokus *et al.*, 2008; Teyssier *et al.*, 2008; Osabe *et al.*, 2014). Le pourcentage global de méthylation de l'ADN chute de 18 à 12% au cours du débourrement chez le châtaignier (Santamaría *et al.*, 2009), et de 27,2% à 21,0% chez le pommier (Kumar *et al.*, 2016). Le gène *MET1* est également impliqué dans la mise en place de l'architecture chez l'arabette, le mutant *met1-1* étant hyper-ramifié et présentant un retard de floraison, ainsi qu'une surproduction de feuilles avant l'initiation de la floraison par rapport au sauvage (Kankel *et al.*, 2003). L'équipe de Kou *et al.* (2011) a démontré qu'une carence sévère en nitrate d'ammonium provoque une hyperméthylation de certains sites dans le génome des feuilles chez le riz, dont l'état épigénétique est transmis à la descendance, la rendant plus tolérante à ce type de stress.

**L'acétylation des histones.** Le transfert de groupements acétyles sur les lysines de la queue des histones par une Histone acétyltransférase neutralise les charges positives. L'ADN étant chargé négativement, les histones et l'ADN se repoussent, rendant possible la transcription. À l'inverse, l'élimination des groupements acétyles des lysines de la queue des histones par une histone désacetylase rétablit les charges positives. L'ADN et les histones étant alors de signes inversés, ils s'attirent : la transcription est impossible. Le niveau d'expression des gènes codant les différents variants protéiques qui composent les histones sont considérés comme des marqueurs de la division cellulaire. L'histone H3 est par exemple un marqueur de la progression du cycle cellulaire vers la phase S au cours de laquelle a lieu la synthèse d'ADN, notamment dans les bourgeons à la levée de la paradormance chez l'euphorbe (Anderson *et al.*, 2005; Horvath *et al.*, 2005). L'acétylation des histones est associée au débourrement des bourgeons du tubercule de pomme de terre (Law and Suttle, 2004). Chez les plantes, le niveau d'acétylation de la queue de l'histone H4 dans les bourgeons apicaux augmente de manière concomitante avec la baisse du niveau de méthylation de l'ADN au cours du débourrement, favorisant ainsi l'activation de la



transcription des gènes chez le châtaignier et l'azalée (Santamaría *et al.*, 2009; Meijón *et al.*, 2009, 2010). Le gène codant l'histone H4 est réprimé dans les bourgeons qui ne débourrent pas en réponse à une carence en azote chez le riz (Luo *et al.*, 2017). En revanche, chez le châtaignier, l'expression du gène *GCN5L*, codant une Histone acétyltransférase, est associée à la dormance des tissus (Santamaria *et al.*, 2011).

**La méthylation des histones.** La déméthylation des lysines (K) en position 4 sur la queue des histones H3 (H3K4) est nécessaire à la croissance de la tige chez le riz (Chen *et al.*, 2013a). Une équipe espagnole a démontré que la lysine 27 de la queue des histones H3 est triméthylée (H3K27me3) chez des gènes de régulation de la dormance (Dormancy-Associated MADS-box tels que DAM 1, 4, 5 et 6) dans les tissus qui débourrent, permettant ainsi l'activation de la transcription de ces gènes chez le pêcher (de la Fuente *et al.*, 2015). L'Histone Méthyltransférase SDG8 permet la di- et tri-méthylation des lysines en position 36 sur la queue des histones H3 (H3K36). Cette enzyme est connue pour être impliquée dans les réponses à la qualité de la lumière (Li *et al.*, 2015) et aux stress mécaniques (Cazzonelli *et al.*, 2014), et dans la régulation de la floraison (Zhao *et al.*, 2005, Xu *et al.*, 2008). De plus, l'Histone méthyltransférase SDG8 régule au moins en partie les voies de biosynthèse des strigolactones et des brassinostéroïdes, régulateurs de croissance impliqués dans la ramification chez l'arabette (Cazzonelli *et al.*, 2009a ; Cazzonelli *et al.*, 2009b ; Dong *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014). La perte d'activité de l'Histone méthyltransférase SDG8 chez le mutant *sdg8-4* chez l'arabette aboutit à l'augmentation du nombre de ramifications (Dong *et al.*, 2008). Cette enzyme est impliquée dans la régulation de la voie de biosynthèse des caroténoïdes. Elle régulerait l'état de méthylation du gène CRTISO (CAROTENOID ISOMERASE) impliqué dans la voie de biosynthèse des strigolactones (Cazzonelli *et al.*, 2009a,b) Il est donc probable d'après les auteurs que lorsque le gène SDG8 est muté, la déméthylation du gène CRTISO provoque une chute de la teneur en strigolactones et donc une stimulation de la ramification tant des parties aériennes que souterraines.

**Les protéines de liaison MBD** (pour « Methyl-CpG-Binding Domain protein »). Ces protéines se fixent sur les séquences d'ADN méthylées dans le contexte CpG et recrutent des complexes protéiques impliqués dans l'extinction de l'expression des gènes, tels que des Histones Déacétylases, des facteurs de transcription inhibiteurs et des protéines de remodelage de la chromatine. Or, les plantes mutantes *mbd9* et *mbd11* fleurissent plus tardivement que les plantes sauvages avec un nombre de bourgeons qui débourrent plus important chez l'arabette (Berg *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2006; Yaish *et al.*, 2009). La mise en



place de ce phénotype n'est en revanche pas liée à la voie de régulation du débourrement par l'auxine et les strigolactones, ni à l'expression du gène *FLC* (Flowering Locus C) impliqué dans l'initiation de la floraison (Peng *et al.*, 2006).

**Les microARN (miARN).** Ce sont des acides ribonucléiques simple-brin et courts (21 à 24 nucléotides), qui sont propres aux cellules eucaryotes. Leur appariement à une séquence complémentaire de l'ARN messager du gène cible conduit à la répression traductionnelle ou à la dégradation de cet ARNm. Plusieurs études ont démontré des liens entre les miARN et le débourrement des bourgeons. L'expression du gène codant le miR159 est corrélée à celle de sa cible, le gène *GAMYB*, suggérant un rôle des miARN dans l'inhibition du débourrement chez la canne à sucre (Ortiz-Morea *et al.*, 2013). Une étude récente a démontré que l'azote stimule l'expression du gène codant le miR393 qui inhibe l'expression du gène *BRC1* chez le riz (Li *et al.*, 2016) et des gènes codant des transporteurs et des récepteurs à l'auxine (*OsAUX1*, *OsTIR1* et *OsAFB2*, Xia *et al.*, 2012). Le miR171c inhibe le débourrement chez l'arabette, en ciblant les transcrits des gènes codant des facteurs de transcription de la sous-famille SCR (SCARECROW, gènes *SCL6-II/III/IV*, Wang *et al.*, 2010b), appartenant elle-même à la famille des protéines GRAS (« GIBBERELLIN INSENSITIVE, REPRESSOR of ga1-3, SCR », Pysh *et al.*, 1999). Chez les plantes sur-exprimant le gène *miR171c* et chez les triples mutants *scl6*, le nombre d'axes II et l'élongation racinaire sont réduits, alors que les tissus photosynthétiques accumulent de fortes teneurs en chlorophylle et que des feuilles et des fleurs se forment. Ces résultats chez l'arabette ont été confirmés dans le cadre de la floraison chez l'orge, où la surexpression du gène codant le miR171a perturbe l'organisation du méristème et conduit à inhiber le débourrement (Curaba *et al.*, 2013). De nombreux miARN sont également connus pour être exprimés en fonction de la disponibilité en azote chez l'arabette. En effet, les miR-169, 171, 395, 397, 398, 399, 408, 857 sont réprimés en réponse à une carence en azote, tandis que les miARN-160, 780, 826 et 846 sont stimulés. Le miR171 serait impliqué dans le développement racinaire en réponse à une carence en azote chez l'arabette (Liang *et al.*, 2012). Ainsi, de nombreux miARN, dont les cibles sont encore peu renseignées, sont impliqués dans le débourrement et/ou sont sous la régulation de l'azote.

Au même titre que l'azote, les sucres sont également connus pour stimuler l'expression des miARN. En effet, différents sucres issus de la photosynthèse dans les feuilles chez le tabac et l'arabette inhibent l'expression du gène codant le miR156, dont les cibles sont les facteurs de transcription de la famille des SPL (« Squamosa promoteur binding Protein-Like ») dont la baisse d'expression active la transition entre les différentes phases de croissance des plantes



(Yang *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2013, 2015, Guo *et al.*, 2017). Ainsi, il est possible que l'expression des gènes codant des miARN soit régulée par stimulée en les sucres au cours du débourrement, processus pouvant être considéré comme une nouvelle phase de croissance importante dans le cycle de la plante.

L'ensemble de ces données bibliographiques suggère que de nombreuses marques épigénétiques (méthylation des cytosines de l'ADN, méthylation et acétylation des histones, protéines MBD, miARN) pourraient être impliquées dans la régulation du débourrement chez le rosier, éventuellement en synergie avec la température, la lumière, les régulateurs de croissance, les sucres et la nutrition azotée. Dans le cadre de ces travaux, l'évolution du niveau global de la méthylation de l'ADN au cours du débourrement a été étudiée, et une liste plus globale et sans *a priori* des gènes codant des acteurs de la régulation épigénétique a été établie par séquençage des transcrits à haut débit (RNA sequencing).



# OBJECTIFS

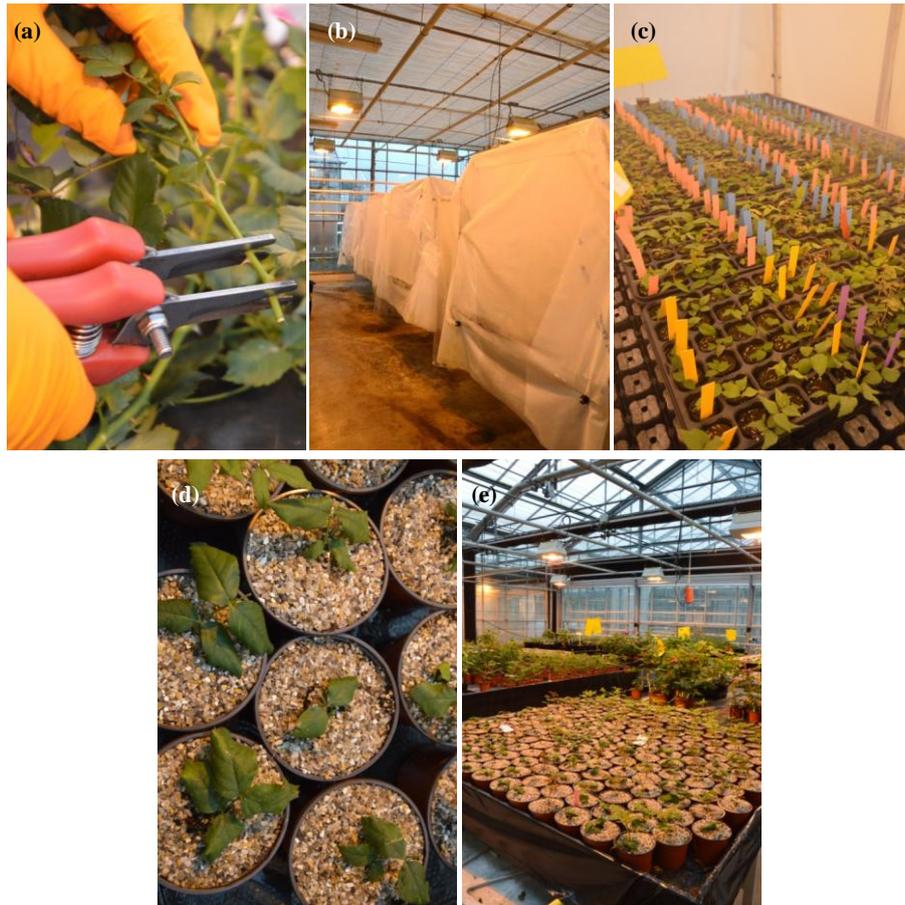
L'azote est impliqué dans la croissance des plantes, et affecte notamment le développement des jeunes organes comme les axes secondaires issus du débourrement des bourgeons. Plusieurs études ont démontré que la concentration en acides aminés augmente dans la sève au cours de la reprise de croissance printanière, dont le débourrement des bourgeons et la nutrition des axes II qui en sont issus constituent une étape initiale déterminante. L'identité et l'origine des espèces azotées impliquées dans le débourrement et les premières phases d'allongement des axes II n'ont pas été clairement établies. Il découle des éléments ci-dessus les points adressés dans ce travail :

- étudier l'implication de la nutrition azotée dans le nombre de bourgeons qui débourrent le long d'un axe à l'échelle de la plante entière décapitée. Ceci a été réalisé en utilisant différentes modalités d'alimentation en nitrate à l'origine de phénotypes de ramification contrastés, pour lesquels ont été analysés les différentes espèces azotées (nitrate, ammonium, acides aminés) dans la sève et les tissus, ainsi que les sucres dans les tissus.
- déterminer l'identité et l'origine (assimilation courante ou réserves) de ces molécules azotées impliquées de manière directe dans l'alimentation des axes II en croissance, par une approche combinant la culture *in vitro* de bourgeons et le marquage isotopique à l'azote  $^{15}\text{N}$ .
- obtenir une connaissance étendue des différences transcriptionnelles caractérisant un bourgeon dormant et un bourgeon conditionné pour débourrer en réponse au nitrate en présence de saccharose, par une approche sans *a priori* (séquençage des transcrits à haut débit, RNAseq), afin de déterminer les voies métaboliques impliquées dans ce phénomène.
- étudier le statut des régulateurs de croissance, dans leurs aspects quantitatifs et en déterminant le niveau d'accumulation des transcrits de certains gènes de leur voie de biosynthèse, dans des contextes nutritionnels autorisant ou non le débourrement des bourgeons.

Ces différentes approches ont permis d'établir un modèle du débourrement du bourgeon intégrant ces nouvelles connaissances.



# MATÉRIELS ET MÉTHODES



**Figure 17 : étapes de production des boutures de *Rosa hybrida*.**

**(a)** Prélèvement des boutures sur les pieds-mère. La tige est taillée 1,5 cm au-dessus et 1 cm au-dessous d'un bourgeon.

**(b-c)** Les boutures sont insérées dans des mottes de substrat favorisant la différenciation de racines durant 4 à 5 semaines sous un tunnel à saturation hygrométrique.

**(d)** Empotage des boutures enracinées dans un substrat dépourvu d'amendement et recouvert d'une couche de silice.

**(e)** Plantes en développement sur tablette de culture en serre.

*Photos : Marie-Anne Le Moigne.*

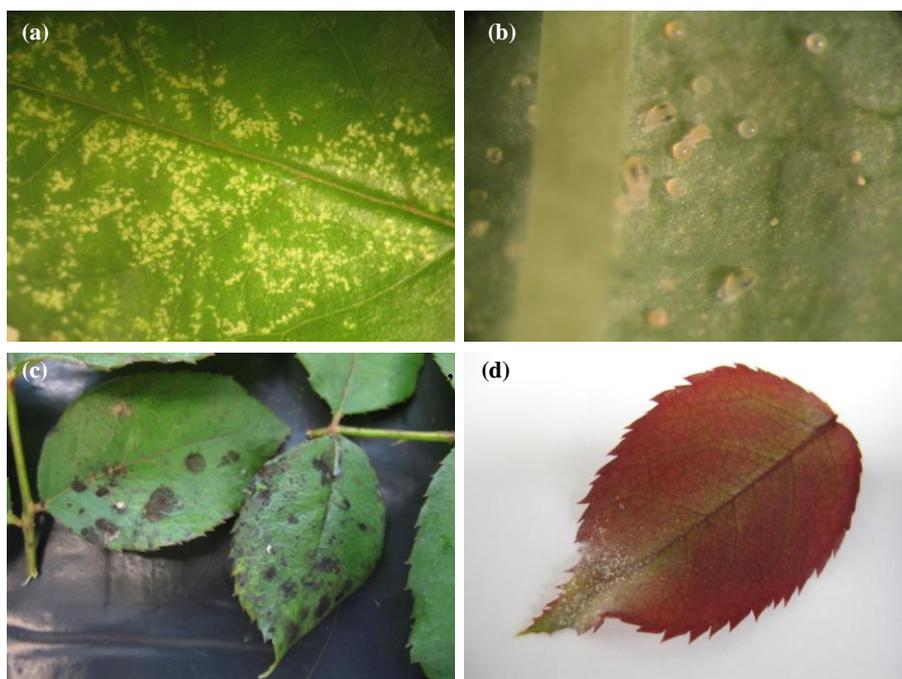
## **I° Culture en serre et maintien de l'état phytosanitaire du matériel végétal**

Depuis 2005, les membres de l'équipe Arch-E étudient la mise en place de l'architecture de la plante modèle *Rosa hybrida* 'Radrazz' (Knock out®) en relation avec l'environnement abiotique. Des boutures portant des feuilles à cinq ou sept folioles sur la partie médiane des tiges sont prélevées sur les pieds-mère et plantées dans des mottes FERTISS (FERTIL, SAS, Boulogne Billancourt, France). L'enracinement a lieu pendant quatre à cinq semaines dans un tunnel à fort degré hygrométrique (80-90 %). Les boutures enracinées au terme de cette période sont transférées dans des pots de 500 mL contenant un mélange de tourbe, de fibres de coco et de perlite (70/20/10 ; v/v/v), sans adjonction de l'amendement habituellement utilisés dans l'équipe (PGMix, 2kg/m<sup>3</sup>). Le substrat est recouvert d'une couche de silex pour limiter dès cette étape le développement de microalgues. Les jeunes plantes sont placées en serre à  $25 \pm 5^\circ\text{C}$  et disposées sur des tablettes en aluminium profondes d'une dizaine de centimètres où elles sont irriguées avec une solution nutritive commerciale (Peter Excelscotts®) contenant 12 mM de nitrate (Figure 17).

Un traitement phytosanitaire est réalisé chaque semaine à la serre pour garantir un état sanitaire des plantes adéquat pour mener les expériences prévues. Les traitements réalisés permettent notamment de lutter contre les pucerons, les œufs et les formes adultes d'acariens (matières actives respectivement : Flonicamide et Milbemectine à hauteur de 0,14 g/L ; Figure 18) De plus, en guise de prophylaxie, les feuilles de boutures sont retirées à la lame de rasoir dès le débourrement du bourgeon de la bouture pour éviter toute propagation d'acariens. Des auxiliaires de culture (*Amblyseius andersoni*) sont également déposés sur le terreau des plantes tout au long de la culture à la serre et en chambre de culture pour limiter le développement de pucerons. Des panneaux d'adhésifs sont également disposés pour éliminer les mouches de terreau (Figure 19).

## **II° Culture de plantes en conditions contrôlées**

Les boutures produites dans les conditions définies précédemment sont transportées de la serre au laboratoire, une semaine après leur empotage (stade bouture). Les plantes sont placées dans une chambre de culture en PAR fort ( $350 \pm 50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), en lumière blanche selon une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures de nuit (Figure 19). La température à l'intérieur de la chambre de culture est de  $22^\circ\text{C}$ . L'arrosage se fait manuellement tous les deux jours environ, par sub-irrigation. Les plantes sont décapitées au-



**Figure 18 : pathogènes de *Rosa hybrida* présents en serre.**

(a) Symptômes foliaires d'une attaque d'acariens.

(b) Vue à la loupe binoculaire d'une face inférieure de feuille colonisée par des acariens aux stades oeuf et adulte.

(c) Symptômes foliaires d'une attaque de tache noire (*Marssonina rosae*).

(d) Symptômes sur jeune feuille d'une attaque d'oïdium sur une jeune feuille de l'apex.

Photos : Marie-Anne Le Moigne.



**Figure 19 : culture des rosiers au laboratoire en conditions contrôlées.**

Les plantes (*Rosa hybrida*) sont placées sous des rampes lumineuses en condition de PAR fort ( $350 \pm 50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), en photopériode L:D 16:8 (tubes LED Power, 30W/B65, 150 cm, France). La température à l'intérieur du module est de  $22 \pm 1$  °C. Les plantes sont disposées dans différents bacs qui permettent de réaliser en parallèle les différents apports nutritifs par sub-irrigation.

Photos : Marie-Anne Le Moigne.

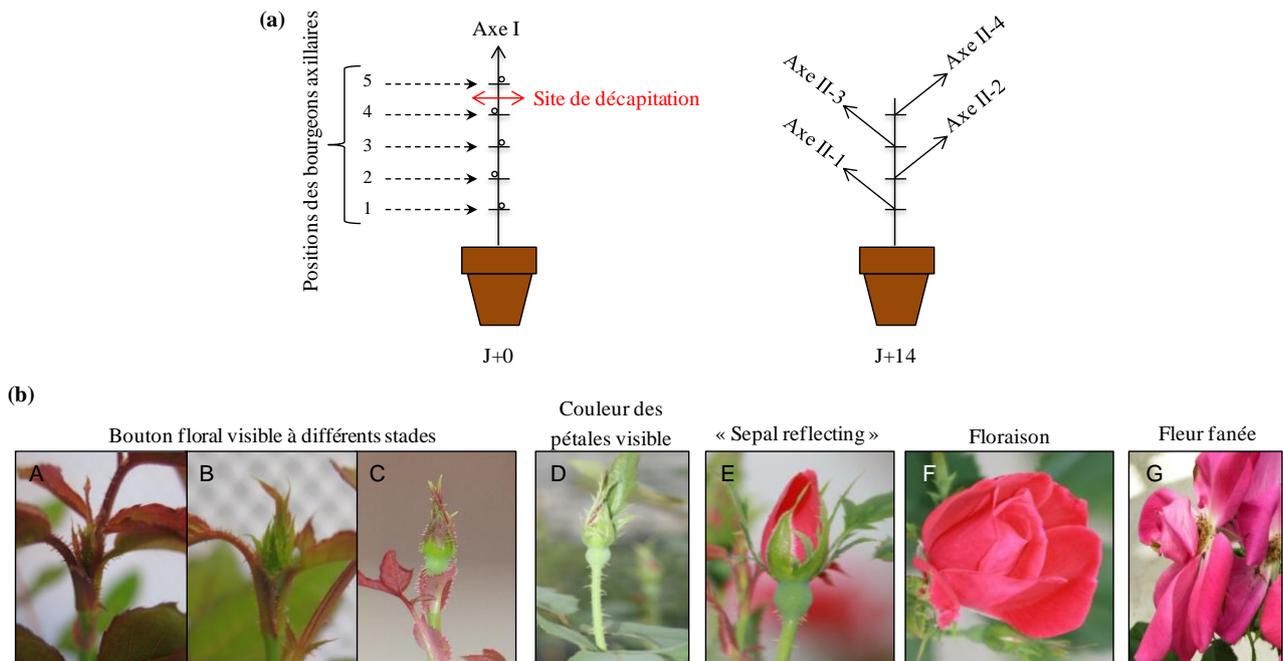
dessus du quatrième phytomère à la lame de rasoir lorsque la cinquième feuille est en cours de développement et que le bouton floral vient de se former (Figure 20b, stade A). La décapitation consiste à exciser l'apex et les jeunes feuilles à la lame de rasoir pour supprimer les organes qui produisent l'auxine, régulateur de croissance connu pour inhiber le débourrement. La levée de la dominance apicale qui survient alors permet d'initier et d'homogénéiser le débourrement des bourgeons des plantes d'un même lot. Les plantes peuvent également être gardées intactes pendant toute l'expérience pour étudier l'effet des traitements sur la floraison. L'allongement des axes II issus du débourrement des bourgeons situés le long de l'axe I est mesuré en cinétique (J+0 à J+14, Figure 20a) à l'aide d'un pied à coulisse numérique (MAC Allister 11W16, modèle 0-150 mm).

#### 1- Culture en présence d'une forte concentration de nitrate

La condition contrôle correspond à des plantes cultivées en présence de 12 mM de nitrate (0.75 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.5 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 49 mg/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, solution commerciale oligoéléments Kanieltra<sup>®</sup> 1mL/10L) par la solution nutritive tout au long de la culture, du repotage au phénotypage (Figure 21). D'autres plantes ont elles été arrosées quelques heures avant la décapitation et jusqu'au phénotypage avec une solution nutritive contenant 12 mM de nitrate et 12 mM de tungstate de sodium, un inhibiteur de la nitrate réductase (traitement « N12+W », Figure 21), pour étudier l'effet de l'inhibition de l'incorporation du nitrate absorbé dans les racines sur la mise en place de l'architecture. Le tungstate agit en entrant en compétition avec la nitrate réductase pour le molybdate, tout en dérégulant l'expression du gène qui la code (Deng *et al.*, 1989).

#### 2- Culture en conditions limitantes en nitrate

Le substrat est dans ce cas rincé cinq fois à l'eau claire une semaine après l'empotage (semaine 5, Figure 21), pour en éliminer les traces d'azote, avant que le bourgeon de la bouture ne débouffe. Les plantes sont alors arrosées avec une solution nutritive contenant 2 mM ou 6 mM de nitrate (0.75 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.5 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 49 mg/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, et une solution commerciale oligoéléments Kanieltra<sup>®</sup> 1mL/10L) pendant une semaine, jusqu'au développement de deux à trois feuilles (semaine 6, Figure 21). À ce stade, le substrat est à nouveau rincé et les plantes sont arrosées avec une solution nutritive dépourvue de nitrate. Les plantes sont décapitées au-dessus du quatrième bourgeon lorsque la cinquième feuille est formée et que le bouton floral est tout juste visible (Figure 20b, stade A).



**Figure 20 : morphologie du modèle expérimental (*Rosa hybrida*).**

(a) Zone de débournement des bourgeons après décapitation de l'axe I (entre le 4<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> phytomère), formant les axes II-1 à -4 présents après 2 semaines (J+14).

(b) Stades successifs de formation de la fleur de *Rosa hybrida*. La décapitation des plantes a lieu au stade A « bouton floral visible », le même que celui utilisé pour la production des explants pour la culture *in vitro*.

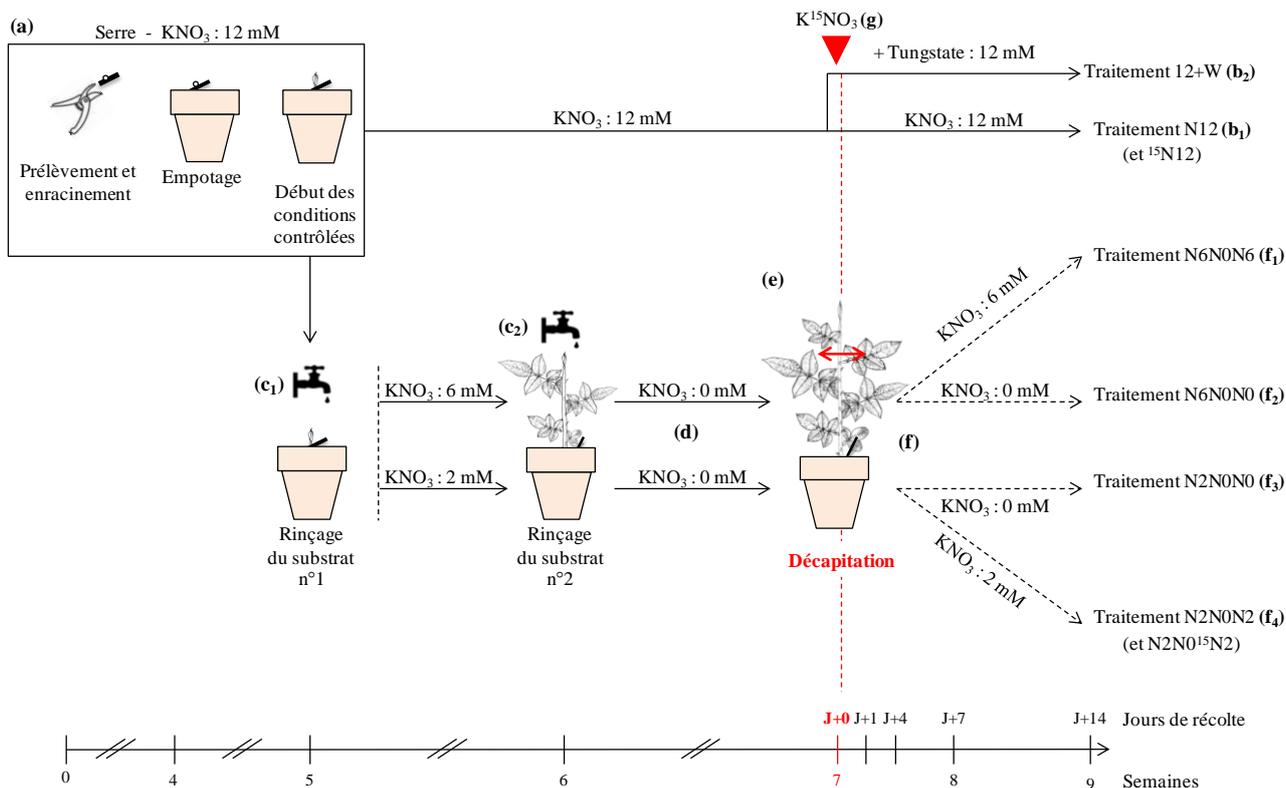
Modifié à partir du travail de post-doctorat de G. Guéritaine (2007). Photo du stade A : Marie-Anne Le Moigne.

Certaines plantes sont ensuite arrosées à nouveau avec la même solution nutritive que celle utilisée avant la carence (soit 2 mM ou 6 mM, correspondant aux traitements N2N0N2 ou N6N0N6 respectivement), alors que d'autres plantes sont maintenues en carence prolongée en azote (correspondant aux traitements N6N0N0 ou N2N0N0) jusqu'au jour du phénotypage et/ou de la récolte. Ainsi, cette procédure met en place quatre traitements contrastés en ce qui concerne les apports en nitrate. Dans les figures de ce manuscrit, ces traitements sont nommés N6N0N6, N6N0N0, N2N0N2 et N2N0N0 (Figure 21) en référence à la concentration de nitrate dans la solution nutritive au cours des trois principales étapes de culture en conditions contrôlées.

### III° Culture *in vitro* de bourgeons

1- Culture *in vitro* de bourgeons de la base et du sommet de l'axe I sur un milieu MS(+N) classique

Une étude préliminaire a été menée pour mettre au point le protocole de culture *in vitro* destiné à étudier l'implication dans le processus de débourrement des bourgeons et d'allongement des axes des acides aminés présents dans la sève. Des plantes sont cultivées en serre sur un substrat dépourvu d'amendement et arrosées avec une solution nutritive contenant 12 mM de nitrate, jusqu'au développement de la cinquième feuille de l'axe I et de l'apparition du bouton floral (Figure 20b, stade A). Les rosiers sont alors âgés de quatre à cinq semaines. Les quatre bourgeons de l'axe I sont excisés à la lame de rasoir en conditions stériles, sous une hotte à flux laminaire. Ils se trouvent de ce fait décontextualisés de l'axe I, ce qui permet d'étudier leur comportement individuel en intégrant leur position initiale. Les nœuds entourés sont immergés dans de l'eau stérile pour limiter la cavitation dans les faisceaux, avant d'être désinfectés quelques secondes dans un bain d'éthanol 70 %. Chaque portion de tige est alors recoupée (environ 0.5 cm de part et d'autre du bourgeon) et légèrement enfoncée dans le milieu gélosé. Le bourgeon, maintenu hors de la gélose, est orienté vers la lumière. Dans le cadre de cette expérience, le milieu de culture gélosé contient 8 g/L d'agar, 4,4 g/L de milieu Murashige & Skoog classique comportant différentes formes d'azotes amenées par les macroéléments (Duchefa Biochimie M0245, Tableau 1a, Murashige & Skoog, 1962), et 100 mM de saccharose. Le mannitol (100 mM) est un sucre non-métabolisable chez les rosiers qui a été utilisé comme témoin osmotique (Henry *et al.*, 2011). Un antibiotique (Plant Preservative Medium, Plant Cell & Technology ; 2 mL/L) est ajouté juste avant de couler le milieu lorsque sa température atteint environ 60°C afin d'éviter sa dégradation par la chaleur.



**Figure 21 : itinéraires de culture utilisés pour les expériences menées dans le cadre de ce travail.**

(a) Production des plantes en serre.

(b) Plantes sur milieu :

+ Nitrate (12 mM, traitement N12, **b<sub>1</sub>**)

+ Nitrate (12 mM) + tungstate\* (12 mM, traitement N12+W, **b<sub>2</sub>**).

\* *inhibiteur de l'activité nitrate réductase*

(c<sub>1</sub>-c<sub>2</sub>) Rinçage du substrat (élimination de la charge ionique, c<sub>1</sub>) et premiers apports contrôlés (2 ou 6 mM, c<sub>2</sub>).

(d) Semaine de carence en nitrate.

(e) Décapitation

(f) Seconds apports contrôlés :

+ 6 mM de nitrate (Traitement N6N0N6, **f<sub>1</sub>**)

+ 0 mM de nitrate (Traitement N6N0N0, **f<sub>2</sub>**)

+ 0 mM de nitrate (Traitement N2N0N0, **f<sub>3</sub>**)

+ 2 mM de nitrate (Traitement N2N0N2, **f<sub>4</sub>**)

(g) Apports de nitrate marqué au  $^{15}\text{N}$  à partir de la décapitation pour certaines expériences en traitements N12 et N2N0N2.

Les boîtes de Pétri sont étanchéifiées à l'aide de parafilm® et placées dans une chambre de culture en PAR fort ( $350 \pm 50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), sous une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. La température moyenne est de 22°C (Figure 22). L'allongement des axes II issus du débourrement des bourgeons a été mesuré quotidiennement pendant une semaine à l'aide d'un pied à coulisse numérique. Des échantillons de bourgeons ont été récoltés 24 et 168 heures après leur mise en culture (J+1 et J+7 respectivement), et immédiatement congelés dans l'azote liquide.

### 3- Culture *in vitro* de bourgeons médians maintenus sur un fragment de tige de taille variable

Le protocole précédemment décrit (milieu Murashige & Skoog classique, Tableau 1a, 100 mM de saccharose) a été reproduit à l'identique, en faisant varier la taille du fragment de tige conservé de part et d'autre de bourgeons médians issus de l'axe I (0.5 cm ou 0.1 cm, Figure 23). Les boîtes de Pétri sont isolées du milieu extérieur à l'aide de parafilm et placées dans des caissons lumineux en PAR fort ( $350 \pm 50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , Figure 22), en lumière blanche selon une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité, avec une température moyenne de 22°C. Les axes II sont récoltés et pesés après une semaine de culture.

### 4- Culture *in vitro* de bourgeons médians en présence de différentes sources d'azote

Dans le cadre de cette expérience, la taille du fragment de tige qui porte le bourgeon médian a été fortement réduite (0.1 cm de part et d'autre du bourgeon). Les réserves internes à la tige sont ainsi minimisées de manière à permettre à chaque bourgeon d'exprimer la potentialité de croissance qui lui est propre, en limitant en particulier l'intervention des molécules présentes dans la tige au moment de la mise en culture. Le milieu de culture utilisé est l'équivalent du milieu Murashige et Skoog classique (Murashige & Skoog, 1962) mais dépourvu de toute source d'azote (Tableau 1b). Les solutions mères de macroéléments (sans source d'azote), de microéléments et de vitamines (sans glycine) sont donc conçues et assemblées entre elles et en présence ou en l'absence de sucres (saccharose, fructose, glucose ; 100 mM). Le nitrate de potassium, le chlorure d'ammonium (10 mM) ou les différents acides aminés (10 mM ; filtre 200  $\mu\text{m}$ ) sont ajoutés après autoclavage, juste avant de couler le milieu lorsque celui-ci a légèrement refroidi (60°C environ) pour éviter leur dégradation par la chaleur. Les molécules sont ajoutées seules au milieu ou combinées entre elles (glutamine et aspartate ou ammonium et aspartate, à hauteur de 5 mM ou 10 mM pour chaque molécule). Des gammes de concentrations (0 à 30 mM) de nitrate, d'asparagine,

**Tableau 1 : comparaison de la composition des milieux utilisés en culture *in vitro*.**

**(a)** Milieu Murashige & Skoog non modifié « MS(+N)».

**(b)** Milieu Murashige & Skoog reconstitué de manière à supprimer toute source d'azote (« MS(-N) »). Ce milieu sert de base que l'on complète avec divers composés : des sucres (saccharose, glucose, fructose, mannitol) et/ou une source d'azote (nitrate, ammonium, acides aminés).

		(a) Milieu MS(+N)	(b) Milieu MS(-N)
Macroéléments	KNO <sub>3</sub>	18,79 mM	0 mM
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	20,61 mM	0 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25 mM	1,25 mM
	MgSO <sub>4</sub>	1,50 mM	1,50 mM
	CaCl <sub>2</sub>	3 mM	3 mM
	KCl	0 mM	5 mM
Microéléments	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1 μM	0,1 μM
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,1 μM	0,1 μM
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	100 μM	100 μM
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	100 μM	100 μM
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1 μM	1 μM
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	30 μM	30 μM
	KI	5 μM	5 μM
Vitamines	Glycine	26,64 μM	0 μM
	Myo-Inositol	554,94 μM	554,94 μM
	Nicotinic acid (vit B3)	4,06 μM	4,06 μM
	Pyridoxine HCl (vit B6)	2,43 μM	2,43 μM
	Thiamine HCl (vit B1)	0,30 μM	0,30 μM
1,25 mL de FeNaEDTA (200X)			

d'aspartate et de glutamine ont été réalisées en présence ou en l'absence de saccharose (100 mM), ainsi que des gammes de saccharose (0 à 250 mM) en présence de ces différentes sources d'azote (à leur concentration physiologique dans la sève, Figures 32 et 34). Les boîtes de Pétri ont été placées dans des chambres lumineuses en PAR fort ( $350 \pm 50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), en lumière blanche selon une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité, avec une température moyenne de 22°C (Figure 22). L'allongement des axes II issus du débourrement des bourgeons a été mesuré après une semaine à l'aide d'un pied à coulisse numérique. Des échantillons de bourgeons ont été récoltés 24 heures après leur mise en culture (J+1) et après une semaine (J+7) et congelés dans l'azote liquide.

#### 5- Culture *in vitro* de bourgeons à l'obscurité

De bourgeons médians maintenus sur un fragment de tige réduit ont été cultivés *in vitro* sur un milieu Murashige et Skoog dépourvu de toute source d'azote (Tableau 1b) dans lequel une source d'azote (nitrate ou asparagine, 10 mM) et du saccharose (100 mM) ont été ajoutés. Certaines boîtes de Pétri ont été placées à la lumière pendant la première journée (photopériode 16h/8h), puis entourée de papier aluminium et placée à l'obscurité. D'autres boîtes de Pétri ont été placée à l'obscurité dès la fin du protocole de mise en culture. L'allongement des axes II issus du débourrement des bourgeons a été mesuré après un mois (J+30) à l'obscurité à l'aide d'un pied à coulisse numérique.

#### 6- Culture *in vitro* de bourgeons en présence des régulateurs de croissance

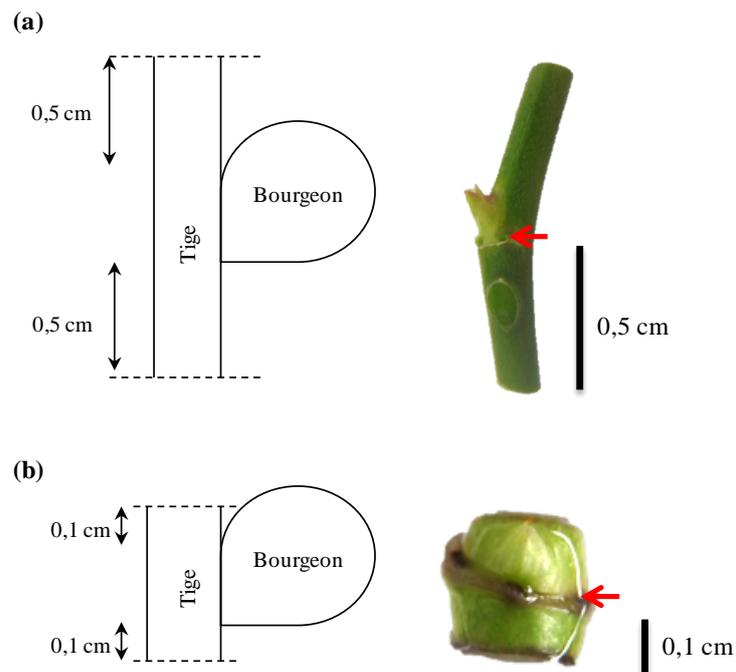
Des bourgeons médians portés par un fragment de tige réduit (0.1 cm de part et d'autre du bourgeon) ont été cultivés sur un milieu Murashige et Skoog dépourvu de toute source d'azote (Tableau 1b) dans lequel une source d'azote (nitrate ou asparagine, 10 mM), du saccharose (100 mM), de l'auxine de synthèse (NAA) ou des cytokinines de synthèse (BAP) ont été ajoutés. La concentration efficace d'auxine pour inhiber le débourrement *in vitro* (2.5  $\mu\text{M}$  – ETH 100) a été choisie à partir de données de l'équipe Arch-E non-publiées (Maria Dolores Perez-Garcia et François Barbier, communication personnelle). Le choix des teneurs en cytokinines testées (1  $\mu\text{M}$  ou 10  $\mu\text{M}$  - DMSO 6%) est basé sur les résultats sur rosier publiés par Roman *et al.* (2016). Les régulateurs de croissance de synthèse ont été ajoutés individuellement au milieu après autoclavage et refroidissement partiel (60°C environ) pour éviter leur dégradation par la chaleur. Les boîtes de Pétri sont isolées du milieu extérieur à l'aide de parafilm et placées dans des caissons lumineux en PAR fort ( $350 \pm 50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ),



**Figure 22 : caisson pour culture *in vitro* d'explants de rosier en lumière blanche.**

La lumière (PAR fort :  $350 \pm 50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) est fournie par des tubes LED (LEDLight, 24W couleur pure, 150cm, Chine) pour une photopériode L:D 16 :8. La température à l'intérieur du caisson est en moyenne de 22°C. Les boîtes de Pétri sont légèrement inclinées pour que la condensation produite à l'intérieur puisse s'évacuer.

*Photos : Marie-Anne Le Moigne.*



**Figure 23 : illustration des deux configurations d'explants utilisés en culture *in vitro*.**

(a) Fragment de tige important (0,5 cm de part et d'autre du bourgeon).

(b) Fragment de tige réduit (0,1 cm de part et d'autre du bourgeon).

Flèche rouge : cicatrice foliaire. Barres noires : échelles.

*Photos : Marie-Anne Le Moigne.*

en lumière blanche (photopériode 16h/8h), avec une température moyenne de 22°C (Figure 22). Des échantillons de tige ont été mesurés 7 jours après leur mise en culture (J+7).

#### **IV° Détermination de l'origine de l'azote retrouvé dans les axes en allongement**

Certaines plantes ont été arrosées à partir de la décapitation (J+0, Figure 21) avec une solution nutritive contenant 12 mM de nitrate marqué à 10 % au  $^{15}\text{N}$  ( $\text{K}^{15}\text{NO}_3$ , Cambridge Isotope Laboratories), de manière à étudier le devenir de l'azote dans la plante en condition contrôle (traitement  $^{15}\text{N}12$ , Figure 21). La même étude a été réalisée pour le traitement  $\text{N}2\text{N}0\text{N}2$  (traitement  $\text{N}2\text{N}0^{15}\text{N}2$ , Figure 21) : les boutures ont été arrosées avec une solution nutritive contenant 2 mM de nitrate jusqu'au stade « 3 feuilles », le substrat est alors rincé, puis l'arrosage poursuivi avec une solution dépourvue de nitrate jusqu'au stade « Bouton Floral Visible ». Le nitrate apporté est marqué au  $^{15}\text{N}$  à partir de la décapitation de l'axe I. Des échantillons de tissus (racines, feuilles, axes II du sommet et de la base, fragments d'axe I du sommet et de la base) ont été récoltés juste avant la décapitation (J+0, échantillons non-marqués) et après une semaine (J+7, échantillons marqués), puis congelés dans l'azote liquide. Du nitrate marqué au  $^{15}\text{N}$  a également été apporté directement dans le milieu de culture dans les expériences de culture *in vitro* des bourgeons isolés (10 mM, tableau 1b). Les échantillons de tissus de tige et de bourgeon ont été récoltés individuellement juste avant la mise en culture (J+0, échantillons non-marqués) et 24 heures après (J+1, échantillons marqués), congelés dans l'azote liquide, lyophilisés (Lyovac SRK System Technik GMBH ; VWR International S.A.S. ; France) et broyés à sec (Retsch de type MM301 ; Allemagne).

- L'implication relative de l'absorption courante et de la mobilisation a été étudiée avant mon arrivée par Pierre-Maxime Furet. Les dosages ont été réalisés à l'UMR EVA de Caen. Les échantillons ont été répartis en fractions de 2 mg dans des capsules en étain et utilisés pour déterminer la teneur totale en azote et l'abondance en  $^{15}\text{N}$  à l'aide d'un analyseur élémentaire (EA3000, Euro Vector, Milan, Italie) couplé à un spectromètre de masse à isotope (Isoprime, GV Instrument, Manchester, UK) calibré pour mesurer l'abondance naturelle en  $^{15}\text{N}$  dans les tissus.

- Les dosages pour déterminer l'origine des acides aminés alimentant les axes secondaires en croissance ont été réalisés sur le Plateau de Profilage Métabolique et Métabolomique (P2M2) du Rheu (INRA de Rennes). Les échantillons ont été répartis en fractions de 10 mg. Les acides aminés ont été extraits par du méthanol/chloroforme/eau



(2/1/2). Du BABA a été utilisée comme étalon interne (100 µM dans le méthanol). Les dosages ont été réalisés en suivant la méthode AccQ•Tag-UPLC-PDA-ESI-MS décrite par Gaudin *et al.* (2014). Cette méthode utilise un réactif de dérivation (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate) qui réagit avec les amines primaires et secondaires en Chromatographie Liquide Ultra Performante (UPLC BEH colonne C18).

La teneur totale en azote (N<sub>tot</sub>) a été calculée d'après la formule :

$$N_{tot} = \frac{(N_{\%} \times DW)}{100}$$

En utilisant la formule:  $\delta^{15}\text{N} = (\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} - 1) \times 1000$ , l'abondance en  $^{15}\text{N}$  (A) a été calculée pour déterminer la teneur en  $^{15}\text{N}$  de chaque échantillon, d'après la formule :  $[\frac{^{15}\text{N}}{^{15}\text{N} + ^{14}\text{N}}]$ .

Pour chaque échantillon, l'excès isotopique (E%excès = A%échantillon - A%témoin) a été calculé. L'A%échantillon représente le pourcentage d'abondance en  $^{15}\text{N}$  dans l'organe considéré et l'A%témoin représente le pourcentage d'abondance naturelle en  $^{15}\text{N}$  du même organe. L'A%témoin était proche de 0,36634, une valeur qui correspond à l'abondance naturelle du diazote atmosphérique (N<sub>2</sub>). A partir de l'E%excès, l'Allocation Spécifique Relative (RSA) a été obtenue d'après la méthode développée par Déleens *et al.* (1984) et Cliquet *et al.* (1990a,b) :

$$RSA = \frac{(A\%échantillon - A\%témoin)}{(A\%source - A\%témoin)} \times 100$$

Dans notre étude, une A%source représente l'abondance en  $^{15}\text{N}$  de la solution nutritive marquée. Pour un organe donné, la RSA peut être approximativement définie comme le rapport de la teneur en  $^{15}\text{N}$  provenant du nitrate marqué au  $^{15}\text{N}$  sur la teneur totale en azote. Pour simplifier la notion de RSA, on peut la définir comme étant le pourcentage d'azote issu du nitrate absorbé après l'application d'un traitement qui est ici l'élimination de l'apex (Visser *et al.*, 1997; Schnyder and de Visser, 1999), et qu'on notera « Azote post-décapitation ».

## V° Mesure de l'activité photosynthétique

L'activité photosynthétique des feuilles de la base et du sommet le long de l'axe I est mesurée dans les différents contextes de nutrition azotée tous les deux jours à partir de la décapitation (J+0, Figure 21), à l'aide du LI-COR (Lincoln, Nebraska, USA) selon le



protocole du fournisseur (22°C, 400  $\mu\text{mol}$  de  $\text{CO}_2$ , 400  $\mu\text{mol}$  de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) à l'aide d'une chambre à fluorimètre (modèle 6400-40, n°LCF-1820 ; USA).

## VI° Mesures de la composition de la sève

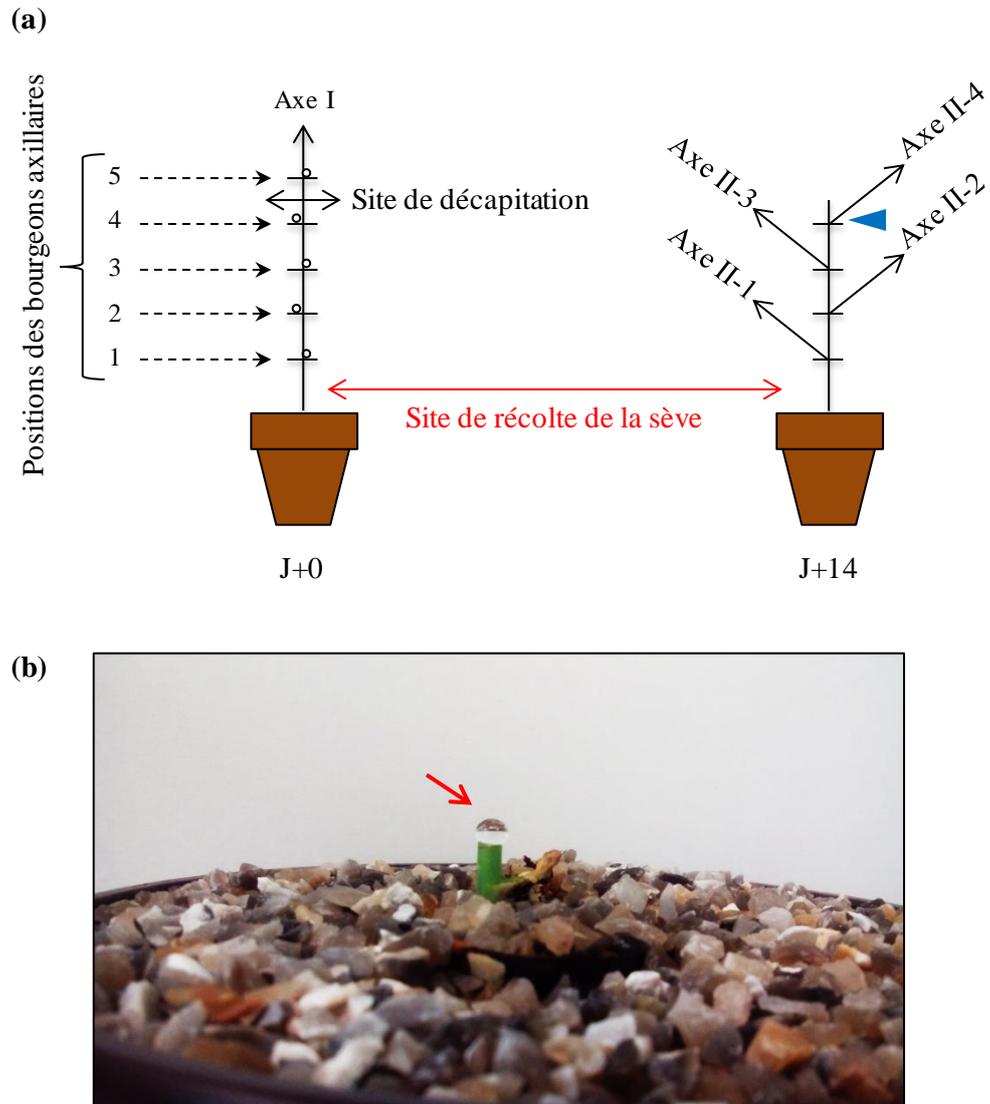
### 1- Dosages des acides aminés par GC-MS

Les plantes sont décapitées entre le terreau et le phytomère le plus basal sur l'axe I. La sève est prélevée à la pipette au fur et à mesure qu'elle est exportée des racines (Figure 24) et est directement plongée dans un tube maintenu dans l'azote liquide. Les dosages ont été réalisés en collaboration avec l'équipe SESaN de l'IRHS, d'après le protocole mis en place par Bobille *et al.* (2016). Les acides aminés de chaque échantillon de sève sont purifiés par passage sur une colonne échangeuse d'ions (Dowex 50WX8-200 ion-exchange resin). Du coton stérile est placé au fond d'une seringue de 2 mL sur un tube collecteur. Environ 1 g de résine, rincée à l'eau dans un grand béccher, est nécessaire par échantillon pour former la colonne au-dessus du coton. Les acides aminés présents dans la sève sont élués par une forte concentration d'hydroxyde d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), qui est ensuite éliminé par évaporation sous vide sous sorbonne pendant une nuit. Le culot est repris dans le mix de dérivation (acétonitrile / triéthylamine / *N-tert*-Butyldimethylsilyl-*N*-methyltrifluoroacetamide) selon les proportions 15/1/15 (30  $\mu\text{L}$  d'ACN, 2  $\mu\text{L}$  de TEA et 30  $\mu\text{L}$  de MTBSTFA par échantillon). L'ensemble est incubé pendant 30 minutes à 95°C. Le surnageant est placé dans un flacon adapté en vue de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (Scion SQ 436-GC ; Brucker).

Les concentrations étant très variables d'un acide aminé à l'autre, chaque échantillon de sève a été analysé deux fois. Une première analyse est issue d'une purification de 50  $\mu\text{L}$  de sève afin de doser les acides aminés faiblement concentrés. Une seconde analyse utilisant des volumes plus réduits (de l'ordre de 10  $\mu\text{L}$ ) a permis de doser les acides aminés fortement concentrés. Deux gammes étalon faisant varier le rapport « acides aminés / étalon interne » ont donc été nécessaires : pour une gamme de 0.5 pM à 50 pM d'acides aminés, il y a 20 pM ou 2 pM d' $\alpha$ -ABA respectivement dans les deux gammes.

### 2- Dosage des acides aminés totaux par la méthode de Rosen

La concentration en acides aminés totaux dans la sève est déterminée par dosage colorimétrique selon la méthode de Rosen (1957), à l'aide d'une gamme étalon de glutamine.



**Figure 24 : sites de collecte de sève.**

(a) Localisation *in planta* du site de prélèvement de la sève totale, juste au-dessous du premier nœud de l'axe I (rouge). La flèche bleue indique le site de prélèvement au sommet de l'axe I pour un essai de dosage de sève dans le cadre du traitement N6N0N6 à J+14.

(b) Illustration de la goutte de sève exsudée sur le site de prélèvement.

*Photo : Marie-Anne Le Moigne.*

Une solution de 100  $\mu\text{L}$  de cyanure de potassium à 0,2 mM (solution-mère à diluer dans l'eau), diluée dans un tampon d'acétate de sodium (54.25 g d'acétate de sodium anhydre, 70 mL d'eau, 16.66 mL d'acide acétique concentré, et QSP 250 mL à pH 5.3), est ajoutée aux extraits de sève à doser (10  $\mu\text{L}$ ) et à chaque point de gamme. Après l'ajout de 100  $\mu\text{L}$  de ninhydrine à 3 % dissoute dans de l'éthylène glycol monométhyl éther, les échantillons sont vortexés et placés au bain-marie à 100°C pendant 15 minutes. L'isopropanol/eau (v/v, 1 mL) est utilisé pour stopper la réaction, avant la lecture sur microplaque des densités optiques à 570 nm.

Cette méthode de dosage des acides aminés totaux a été utilisée dans le cadre d'une expérience où les bourgeons de plantes cultivées en condition contrôle (N12) ont été retirés à la pince à extrémités fines quelques minutes avant la décapitation.

### 3- Détermination du flux d'acides aminés dans la sève

Le volume de sève prélevé par unité de temps ( $\mu\text{L}/\text{h}$ ) est noté au moment de la récolte de la sève à la sortie des racines. La concentration en acides aminés totaux ( $\text{pmol}/\mu\text{L}$ ) dans ces échantillons est déterminée par dosage colorimétrique par la méthode de Rosen. Le flux d'acides aminés dans la sève ( $\text{pmol}\cdot\text{h}^{-1}$ ) est obtenu en multipliant le débit ( $\mu\text{L}/\text{h}$ ) par la concentration ( $\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ).

### 4- Dosage du nitrate dans la sève

La concentration en nitrate est déterminée par dosage colorimétrique selon la méthode de Cataldo (1975). Cette méthode est basée sur la formation d'un dérivé nitro de l'acide salicylique en présence de nitrate. L'acide sulfosalicylique réagit avec le nitrate en condition acide pour former l'acide nitrosulfosalicylique. Un chromophore, dont le maximum d'absorbance se situe à 410 nm, peut se former en condition basique après ajout de soude. Une gamme étalon de nitrate de potassium est réalisée. Les extraits de sève (50  $\mu\text{L}$ ) et de chaque point de gamme sont placés dans des tubes en verre en présence de 200  $\mu\text{L}$  d'acide sulfosalicylique à 5 % (dilué dans de l'acide sulfurique à 95 %). Les tubes sont agités manuellement et laissés refroidir sur paillasse. De la soude (2 N, 4.75 mL) est ajoutée dans chaque tube, agité et refroidi comme précédemment, avant la lecture sur microplaque des densités optiques à 410 nm.



## **VII° Dosage des acides aminés dans les tissus**

Les échantillons congelés de tissus de racines, d'axes II, de feuilles, de tige (de la base et du sommet) issus des traitements N12, N6N0N6, N6N0N0 et N2N0N2 sont lyophilisés, broyés à sec et aliquotés par fractions de  $10\pm 2$  mg. Les échantillons ont été analysés sur le Plateau de Profilage Métabolique et Métabolomique (P<sub>2</sub>M<sub>2</sub>) au Rheu. Les acides aminés ont été extraits au méthanol/chloroforme/eau (2:1:2). Du BABA (DL-3-aminobutyric acid) a été utilisée comme étalon interne (100  $\mu$ M dans le méthanol). Les dosages ont été réalisés par Chromatographie Liquide Ultra Performante (UPLC BEH colonne C18), d'après Gaudin *et al.*, (2014).

## **VIII° Dosage des sucres dans les tissus**

Les échantillons congelés de tissus de racines, d'axes II, de feuilles, de tige (de la base et du sommet) issus des traitements N12, N6N0N6, N6N0N0 et N2N0N2 sont lyophilisés, broyés à sec et fractionnés par  $20\pm 2$  mg. Pour chaque échantillon, 1 mL de méthanol à 80 % est ajouté à la poudre dans les tubes maintenus sur glace. Les échantillons sont incubés à 76°C pendant 15 minutes. Le solvant est éliminé par évaporation sous vide sous sorbonne pendant environ deux heures. Le culot est ensuite solubilisé dans 1 mL d'eau ultrapure et centrifugé 5 minutes à 14 000 rpm à 4°C. Les surnageants sont dilués au  $1/50^{\text{ème}}$  pour les tissus issus de plantes cultivées en condition contrôle et au  $1/20^{\text{ème}}$  pour les tissus issus des plantes sous traitements N6N0N6, N6N0N0 et N2N0N2. Les extraits ont été analysés par HPLC (Carbopac PA-1 column : Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA), d'après Leprince *et al.* (2004). Les dosages ont été réalisés en collaboration avec l'équipe SeSAN de l'IRHS d'Angers.

## **IX° Dosages des régulateurs de croissance dans les tissus de tige cultivés *in vitro***

Les tiges sont récoltées après 24 heures de culture sur le milieu Murashige & Skoog dépourvu de toute source d'azote et dans lequel a été ajouté, individuellement ou de manière combinée, du saccharose (100 mM), du nitrate ou de l'asparagine (10 mM). Les tissus congelés sont lyophilisés, broyés à sec et aliquotés par fractions de  $10\pm 2$  mg à l'aide d'une balance de micropesées (Agrocampus Ouest, Angers). Les échantillons ont été envoyés à la plateforme du centre INRA de Versailles et analysés d'après le protocole récemment établi sur le rosier (Li-Marchetti *et al.*, 2015a) pour déterminer les concentrations de l'auxine,



l'acide abscissique et les différentes formes de cytokinines (ribosides, glucosides, nucléotides, bases).

## **X° Analyses épigénétiques**

### 1- Extraction de l'ADN des bourgeons

L'extraction d'ADN est réalisée sur des échantillons de 10 à 100 mg à l'aide du kit commercial NucleoSpin® Plant II (Genomic DNA from Plant, MACHEREY-NAGEL, Allemagne), selon les conditions définies par le protocole du fournisseur. Cependant, par expérience et d'après les conseils du manuel, il a été décidé d'allonger à une heure le temps de lyse à 65°C afin d'améliorer le rendement de l'extraction. La concentration d'ADN a été déterminée par un dosage au Nanodrop (Spectrophotometer ND-100, Labtech, USA).

### 2- Détermination du taux global de méthylation du génome

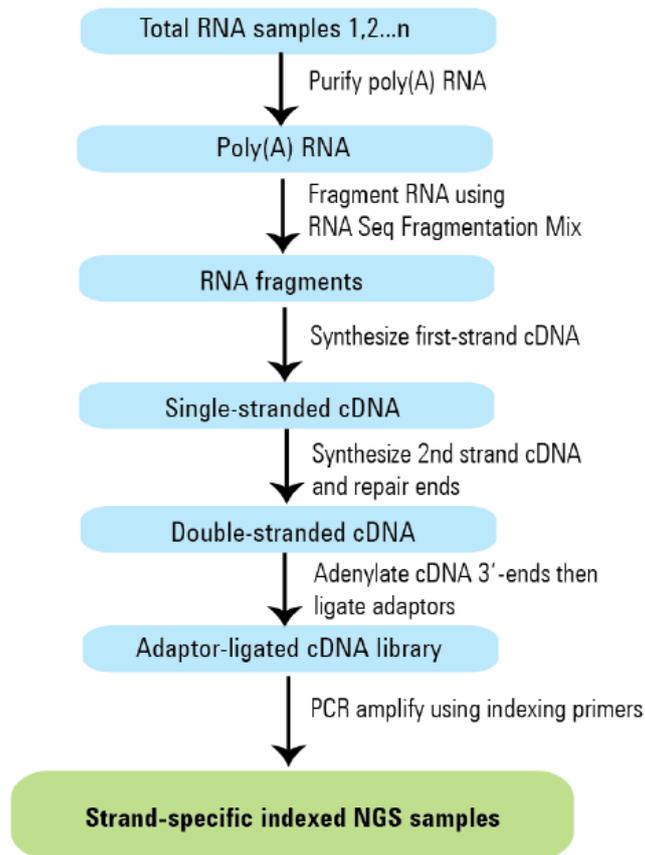
Le dosage colorimétrique du degré de méthylation dans l'ADN génomique global a été réalisé grâce à un kit commercial (MethylFlash™, Methylated DNA, Epigentek), selon les conditions définies par le protocole du fournisseur. Ce kit permet de déterminer le pourcentage en 5-méthylcytosine à partir d'une quantité de 100 ng d'ADN natif. L'ADN se lie aux puits de la microplaque fournie, traités spécifiquement pour avoir une haute affinité avec l'ADN. La fraction méthylée de l'ADN est détectée en utilisant des anticorps de capture et de détection, et est ensuite quantifiée par lecture de l'absorbance dans un spectrophotomètre à lecteur de plaques (SpectrostarNano, BMG LABTECH) : la quantité d'ADN méthylé est proportionnelle à la densité optique mesurée à 450 nm. Cette quantité est rapportée à un standard pour la quantification absolue d'après la formule :

$$5mC(\%) = \frac{\frac{DO_{\text{échantillon}} - DO_{\text{blanc}}}{\text{Quantité d'ADN apportée dans l'échantillon}}}{\frac{DO_{\text{témoin}} - DO_{\text{blanc}}}{\text{Quantité d'ADN apportée dans le témoin à 100\% de cytosines méthylées}}} \times 100$$

## **XI° Analyse des accumulations de transcrits de gènes sélectionnés avec et sans *a priori***

### 1- Séquençage des transcrits à haut débit (RNA sequencing)

En nous appuyant sur les résultats de culture *in vitro*, nous avons choisi d'étudier le transcriptome de bourgeons dont le devenir est différent en termes de débourrement et d'allongement des axes II. Des bourgeons ont été cultivés d'une part uniquement en présence



**Figure 25 : préparation des banques d'ADNc.**

Ce protocole se base sur l'utilisation d'ARN extrait de nœuds (tige et bourgeon) cultivés *in vitro* en présence de 100 mM saccharose (condition de référence) auquel est ajouté 10 mM de nitrate (condition test). Cette étape précède le séquençage réalisé sur un appareil *Miseq*. Document fournit dans le kit *Agilent*.

de saccharose (100 mM, condition de référence) et d'autre part en présence de saccharose et de nitrate (10 mM, condition test). Les nœuds comportant les bourgeons axillaires ont été utilisés après 24 heures de traitement sur ces deux milieux afin d'étudier les réponses précoces. Les nœuds sont broyés dans l'azote liquide et l'ARN extrait selon un protocole mis au point pour le rosier à partir de données bibliographiques (MacKenzie *et al.*, 1997 ; Gambino and Gribaudo, 2006 ; Gambino *et al.*, 2008). Le tampon de lyse chauffé à 80°C contient 4 M de la guanidine de thiocyanate, 25 mM d'EDTA, 2,5 % de PVP40, 2 % de sodium lauroyl sarcosinate et 0,2M d'acétate de sodium à pH 5.5. Un volume de 750 µL a été ajouté sous sorbonne sur la poudre issue du broyage des bourgeons dans l'azote liquide. Les échantillons ont ensuite été incubés à 70°C pendant dix minutes, puis extraits au chloroforme : alcool isoamylique (v/v ; 24 :1). Les tubes ont été centrifugés deux minutes à 11000 g et la phase aqueuse déposée sur la première colonne du kit QIAGEN (RNeasy Mini Kit). La suite du protocole a été réalisée selon les étapes définies par le protocole du fournisseur QIAGEN. Les échantillons ont été dosés sur le Qubit (fluorometer, InVitrogen) et leur qualité vérifiée sur le bioanalyseur Experion (LabChip Caliper, BioRad) qui crée un profil d'électrophorèse virtuel, d'après les étapes définies par le protocole du fournisseur Biorad (Kappa). Ces appareils sont disponibles sur le plateau technique ANAN de la SFR QuaSaV (Angers).

La préparation des banques de transcrits pour les deux échantillons a été réalisée selon les conditions définies par le protocole du kit Agilent (Figure 25). L'ARN poly[A] est sélectionné en se fixant sur des billes magnétiques recouvertes d'oligo(dT). Les acides nucléiques sélectionnés sont coupés chimiquement en fragments d'environ 200 pb et retranscrits en ADN complémentaires. Ces fragments sont sélectionnés par leur taille en faisant varier la concentration de billes dans les puits. Des adaptateurs, qui assurent la fixation des fragments à la cellule de séquençage ont été ajoutés, ainsi que des courtes séquences qui permettent d'identifier la nature des deux échantillons lorsqu'ils sont associés et séquencés sur une même cartouche. La quantification des deux banques de transcrits a été réalisée par q-PCR et un gel d'électrophorèse a permis de connaître la taille des fragments finaux.

Les échantillons dilués à 8-10 pM sont dénaturés par un ajout de soude et introduit dans la cartouche. Pendant les premiers cycles, un cluster est produit par fragment d'ADNc fixé sur la cellule. Ensuite, chaque cluster est amplifié : à chacun des 150 cycles, un nucléotide couplé à un fluorochrome est ajouté pour former au final des séquences de 150 pb. En sortie de séquençage, les millions de séquences ainsi générées sont récupérées et alignées entre elles

**Tableau 2 : séquences des amorces des gènes sélectionnés par l'approche RNAseq.**  
 Les séquences sens et anti-sens, fournies dans le sens 3'-5', ont été déterminées à l'aide du logiciel *Primer3web* version 4.0.0 (<http://primer3.ut.ee/>). Tm : température d'hybridation.

Nom des gènes		Annotations chez <i>Rosa hybrida</i> (annexes I à VII)	Locus et homologie avec l'arabette		Séquences des amorces (5'-3') Sens Anti-sens	Tm	Taille de l'amplicon (pb)	Efficacité
Asparagine synthétase	<i>ASNS2</i>	Rosa_BI_20160929_038594	AT5G65010	74%	GCCATCAAGCATGTCCACAA	59°C	236	99.3%
					ACGGTGATTGTTTCTTGGCC			
Asparaginase	<i>ASNase2</i>	Rosa_BI_20160929_008972	AT3G16150	74%	ATGGCAGGGTTGAGATGGAA	59°C	198	97.5%
					AGTCATTGTCCACCAGCTCA			
Glutamine synthétase	<i>GS2</i>	Rosa_BI_20160929_039521	AT5G35630	79%	TGACTGGAATGGTGCTGGAT	59°C	179	97.4%
					TGCTGGCTGTTTCATGCTTT			
Aquaporine	<i>PIP2-1</i>	Rosa_BI_20160929_012670	AT3G61430	74%	CCCAAGAGAAATGCAAGGGA	59°C	144	97.1%
					ATTGATCCCTGTGCCAGTGA			
Anthocyanidine synthase	<i>LDOX</i>	Rosa_BI_20160929_003892	AT4G22880	70%	CTTCCTGGCTCTGCCTGAAC	59°C	251	93.0%
					CTCCATCGTCATGCACATCG			

jusqu'à former des séquences plus longues. Au cours de ce travail, deux types d'alignement ont été réalisés :

(i) Les séquences ont été alignées sur un transcriptome de référence d'une espèce proche de celle du rosier, ici le fraisier (Shulaev *et al.*, 2011). Le choix du transcriptome de référence s'est fait dans un premier temps par défaut par manque de disponibilité du transcriptome du rosier *Rosa chinensis* (en cours de publication) et due à une annotation trop incomplète de la banque d'EST de *Rosa chinensis* (Dubois *et al.*, 2012). (ii) Les séquences ont secondairement été auto-assemblées entre elles pour former un transcriptome de *Rosa hybrida* et augmenter le pourcentage de séquences capables de s'aligner sur cette nouvelle référence (S. Aubourg, équipe BioInfo de l'IRHS). Ainsi, les résultats de l'analyse statistique sont beaucoup plus robustes et représentatifs de la réalité biologique. Les scripts qui ont permis l'alignement des séquences sur cette référence et l'analyse statistique (edgeR) associée ont été produits par l'équipe BioInfo de l'IRHS (S. Pelletier). L'interprétation biologique de la quantification de l'expression des gènes en réponse à composition des deux milieux testés a nécessité l'utilisation du site Blast2GO.

## 2- Validation des données de RNAseq par q-PCR

Les niveaux d'accumulation des transcrits observés pour quelques séquences identifiées par séquençage à haut débit ont été vérifiés par PCR quantitative sur des échantillons cultivés *in vitro* dans les mêmes conditions (10 mM de nitrate et/ou 100 mM de saccharose). Les extractions d'ARN ont été réalisées d'après le protocole modifié présenté ci-dessus. Des gènes ont été sélectionnés sur la base de leur expression différente dans les deux conditions testées. Les amorces (Tableaux 2 et 3) ont été déterminées à l'aide du site Primer3 à partir des séquences de *Rosa hybrida*. Les séquences sont d'abord amplifiées par PCR classique, puis les amplicons sont déposés sur gels afin de vérifier leur qualité et leur taille, et séquencés pour confirmer leur identité.

Les acides nucléiques (100 ng.  $\mu\text{L}^{-1}$  dans 11  $\mu\text{L}$ ) sont rétro-transcrits en les chauffant à 65°C pendant 5 minutes au thermocycleur en présence de 1  $\mu\text{L}$  d'oligo(dT) à 50  $\mu\text{M}$  et de 1  $\mu\text{L}$  de DNTP à 10  $\mu\text{M}$ , et déposés immédiatement sur glace. Pour chaque échantillon, 4  $\mu\text{L}$  de first-strand buffer (5 X), 1  $\mu\text{L}$  de DTT (0,1 M), 1  $\mu\text{L}$  de RNaseOUT (40 unités.  $\mu\text{L}^{-1}$ ) et 1  $\mu\text{L}$  de SuperScript III RT (200 unités/ $\mu\text{L}$ ) sont ajoutés avant l'incubation à 50°C pendant une heure au thermocycleur et arrêt de la réaction à 70°C pendant 15 minutes.

**Tableau 3 : séquences des amorces des gènes impliqués dans le débourrement.**

L'implication de ces gènes dans le débourrement des bourgeons axillaires a été démontrée au sein de l'équipe Arch-E.

Fonction biologique	Nom des gènes	Séquences des amorces (5'-3')		Publications
		Sens	Anti-sens	
Facteur d'élongation	<i>EF1</i>	TCGTTTTGCTGTGAGGGACATG		Girault <i>et al.</i> , 2008
		TTGGTCACCTTGGCACCAGAT		
Synthèse cytokinines	<i>IPT3</i>	CCACCATTTGCTTGGAGTT		Barbier <i>et al.</i> , 2015
		CTCCAACGATGATTGGAAGC		
Signalisation des cytokinines	<i>ARR5</i>	TGGGATGACAGGATATGAGCTGCT		Roman <i>et al.</i> , 2016
		CTCTGAGGACATGATCACCACTGGA		
Signalisation des strigolactones	<i>MAX2</i>	GCTGCCTATCCCCTTTCCCTC		Djennane <i>et al.</i> , 2014
		AATCCACAGTATCACCAACAAT		
Synthèse d'auxine	<i>YUC1</i>	CGGTTGGCTTCGGAAGAA		Barbier <i>et al.</i> , 2015
		TTGCTATCATAACGGCGTCGTA		
Transporteur d'auxine	<i>PIN1</i>	ACCAAAGATCATAGCATGTG		Barbier <i>et al.</i> , 2015
		ACAAATGGGACAATTCCTTG		
Transporteur de sucre	<i>RhSUC2</i>	GTGCCTTTCTTCAGCGAGATCCT		Henry <i>et al.</i> , 2011
		GAGGCATGTCACCACCAACAA		
Invertase vacuolaire	<i>RhVII</i>	CGGCCAACCTGTCTGATCCCTTA		Girault <i>et al.</i> , 2008
		GGGTCACGGAAATCGGTGGTTAAA		
Facteurs de transcription	<i>BRC1</i>	TGCATTGTTAACCCTCTTGCA		Barbier <i>et al.</i> , 2015
		GTTCTTTCTCTGTCTCGCTCTT		
	<i>TCP11</i>	GAAGGCTCTCAGGGACTCG		M. Wang, non publié
		AACCTCCTCCATTACATCTCTACC		
	<i>TCP20</i>	AGCACCAACACCAACACCAG		
		CAAACCTCAGTCCCCAACAAAATG		

Pour la réaction d'amplification, les échantillons d'ADNc sont dilués au 1/50<sup>ème</sup> et placés sur une microplaque en présence d'une solution contenant 0,4 µL d'amorces sens, 0,4 µL d'amorces anti-sens, 5,2 µL d'eau ultrapure stérile et 10 µL de SybrGreen. Après un chauffage à 94°C pendant 3 minutes, 40 cycles se suivent (15 secondes à 95°C et 50 secondes à 60°C, CFX Connect Real-Time System, Biorad). Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel Bio-Rad CFX Manager software. Les expressions relatives (niveaux d'accumulation des transcrits) des séquences amplifiées sont obtenues en utilisant la méthode  $E^{-\Delta\Delta Ct}$  (efficacité  $^{-\Delta Ct}$ ), avec  $\Delta Ct$  correspondant aux variations d'expression dans le nœud (tige et bourgeon confondus) à J+1 en réponse au nitrate par rapport à la condition de référence (saccharose seul dans le milieu de culture). Les données ont été normalisées en utilisant le niveau d'expression du gène de ménage *RhEF1- $\alpha$*  (Elongation Factor) comme référence (Girault *et al.*, 2010). L'efficacité des amorces a été déterminée à partir de cinq points de gamme et les contrôles négatifs ont été réalisés en remplaçant l'ADNc par de l'eau stérile.

### 3- Quantification de l'expression des gènes impliqués dans le débourrement par q-PCR

Nous avons également étudié le niveau d'expression de gènes impliqués dans le débourrement par les travaux de l'équipe Arch-E (Tableau 3, Figures 5, 7 à 9 et 15). Les analyses ont porté sur des échantillons cultivés *in vitro* en présence de saccharose et/ou de nitrate ou d'asparagine. Les récoltes ont cette fois été réalisées de façon à séparer le bourgeon et la tige en deux échantillons différents, pour affiner les résultats obtenus à l'échelle du nœud en RNAseq. Les séquences des différents gènes sont présentées dans les Tableaux 2 et 3. Les q-PCR ont été réalisées en plaques de 384 puits. Les mix et les échantillons sont assemblés à l'aide de l'automate du plateau technique ANAN. Le protocole et le script pour cette étape ont été modifiés à partir du travail de thèse de F. Perrin (Perrin *et al.*, 2016). Les niveaux d'accumulation des transcrits des séquences amplifiées sont obtenues en utilisant la méthode  $E^{-\Delta Cq}$  (efficacité  $^{-\Delta Cq}$ ), avec  $\Delta Cq$  correspondant aux variations d'expression dans l'organe considéré (tige ou bourgeon séparément) dans différents contextes nutritionnels au cours du temps (J+1 et J+7) par rapport à la condition de référence (J+0 ou J+1 selon la question biologique).

## **XII° Analyses statistiques des résultats**

Chaque expérience a été réalisée trois fois de manière décalée dans le temps. Chaque répétition biologique regroupe au moins quatre plantes pour les expériences *in vivo*. Pour les expériences *in vitro*, chaque répétition biologique comprend au moins trois répétitions



techniques, soit trois boîtes de Pétri contenant chacune une douzaine de nœuds. Nous avons réalisé sur RStudio (version 0.99.879) une Anova sur modèle linéaire suivie d'un test post hoc Student-Newman-Keuls (SNK;  $P < 0.05$ ).

### XIII° Analyses statistiques relatives aux q-PCR

L'objectif des PCR quantitatives (qPCR) est de mesurer la variation du niveau d'expression des gènes d'intérêt, relativement à un gène de référence, en fonction des conditions de culture. Le résultat de chaque qPCR renseigne sur le logarithme du nombre de copies de la séquence recherchée. En effet, l'analyse par régression linéaire des valeurs de Ct obtenues avec la gamme de dilution dans nos conditions donne une équation du type :

$$\log(N \times c) = \frac{(Ct - b)}{a}$$

Avec :

- N : le nombre de copies,
- Ct le cycle seuil,
- a : la pente de la droite (a étant négatif).
- b : ordonnée de la pente.
- c : une constante dont la valeur est inconnue.

On pose les indices  $i$  (pour le gène d'intérêt) et  $r$  (pour le gène de référence),  $t$  (pour le témoin non traité) et  $e$  (pour le traitement étudié). On dispose des données suivantes :

$$\log(Ni_t \times ci) , \log(Ni_e \times ci) , \log(Nr_t \times cr) , \text{ et } \log(Nr_e \times cr).$$

On veut connaître les variations de  $Ni/Nr$  entre les conditions  $t$  et  $e$  soit :

$$Ei = \frac{Ni_e/Nr_e}{Ni_t/Nr_t} = \frac{Ni_e}{Nr_e} \times \frac{Nr_t}{Ni_t} = \frac{Ni_e}{Ni_t} \times \frac{Nr_t}{Nr_e} = \overset{=1}{\frac{\widehat{ci}}{ci}} \frac{Ni_e}{Ni_t} \times \overset{=1}{\frac{Nr_t}{Nr_e} \frac{\widehat{cr}}{cr}} = \frac{Ni_e \times ci}{Ni_t \times ci} \times \frac{Nr_t \times cr}{Nr_e \times cr}$$

$Ei$  étant l'expression relative du gène  $i$  lors du traitement  $e$ .



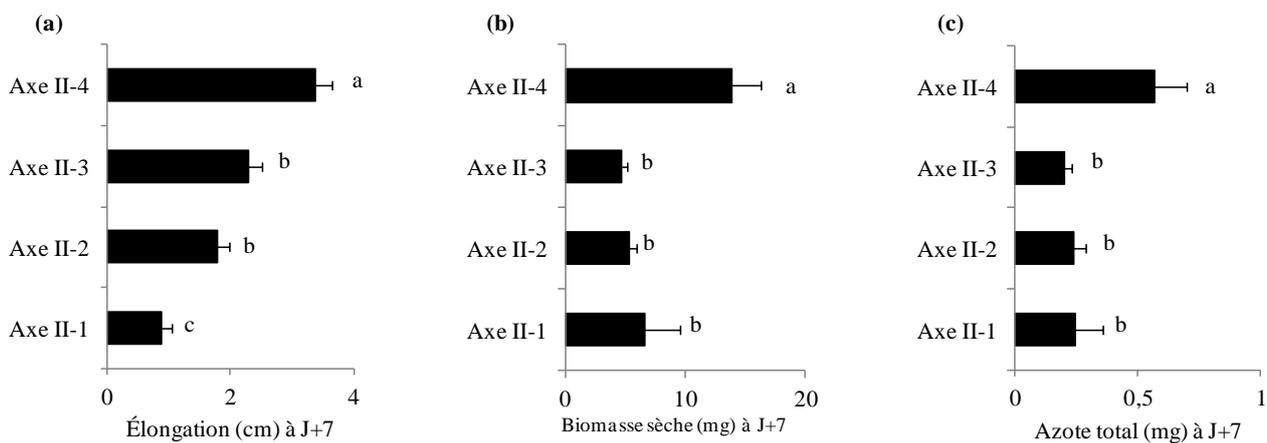
On a donc :

$$\begin{aligned}\log Ei &= \log \left( \frac{Ni_e / Nr_e}{Ni_t / Nr_t} \right) = \log \left( \frac{Ni_e \times ci}{Ni_t \times ci} \times \frac{Nr_t \times cr}{Nr_e \times cr} \right) \\ &= \log(Ni_e \times ci) - \log(Ni_t \times ci) + \log(Nr_t \times cr) - \log(Nr_e \times cr)\end{aligned}$$

En général, les valeurs de Ct obtenues en qPCR suivent des lois normales. Si c'est le cas, les  $\log(N \times c)$  sont des combinaisons linéaires des Ct, elles suivent donc aussi des lois normales.  $\log(Ei)$  devient donc une combinaison linéaire de variables aléatoires suivant des lois normales, elle suit donc elle-même une loi normale. Concrètement, les données de qPCR ont été analysées en réalisant des modèles linéaires. Ceux donnant des résidus normaux ont été considérés comme valides et sont présentés. Ceux ne donnant pas des résidus normaux ont été considérés comme non-valides. À la place, les données correspondantes ont été analysées en utilisant un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis. Les résultats des analyses statistiques relatives aux q-PCR sont présentés en Annexes XV à XVIII.

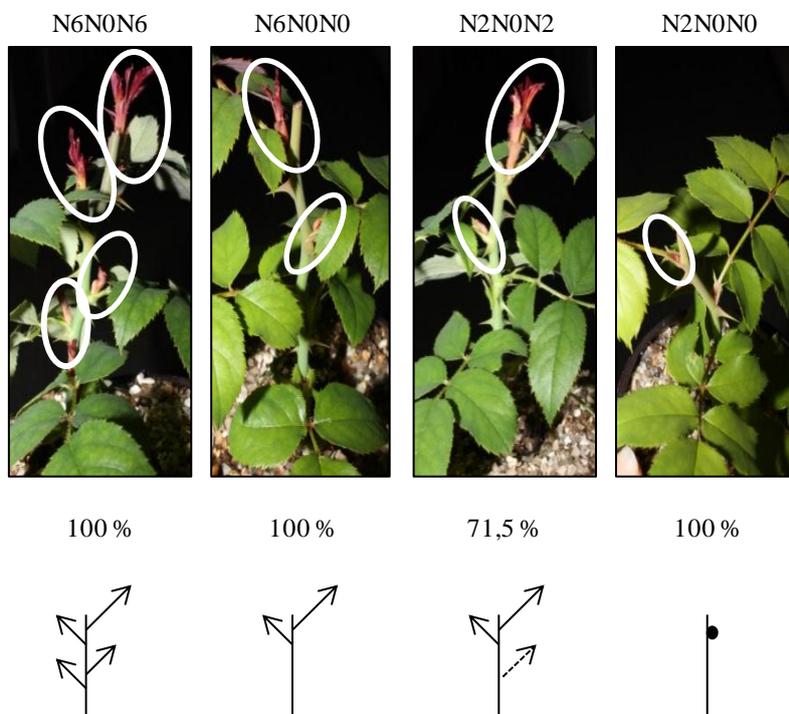


# RÉSULTATS



**Figure 26 : élongation, biomasse sèche et teneur en azote des axes II en fonction de leur position sur l'axe I en réponse au traitement N12.**

Les mesures sont effectuées 7 jours après la décapitation effectuée 7 semaines après le bouturage, chez des rosiers (*Rosa hybrida*) arrosés avec une solution nutritive contenant 12 mM de nitrate (traitement N12). Moyennes de trois expériences indépendantes  $\pm$  les erreurs standards. Les lettres indiquent les différences significatives d'élongations, de biomasses et de teneurs en azote entre les axes II (test de Student et Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ). Résultats tirés de la thèse de P.M. Furet (2010-2013).



**Figure 27 : phénotypes de *Rosa hybrida* obtenus 7 jours après la décapitation (J+7) en réponse à différents traitements azotés indiqués au-dessus des photos.**

Les pourcentages de débourrement ainsi que les représentations schématiques des plantes sont indiqués pour chaque condition de culture. Sur les schémas les axes II en allongement sont repérés en traits pleins. Les bourgeons en position II-3 (Figure 12) ne débourrant pas systématiquement dans le cadre du traitement N2N0N2 sont représentés en traits pointillés.

## I° Phénotypage

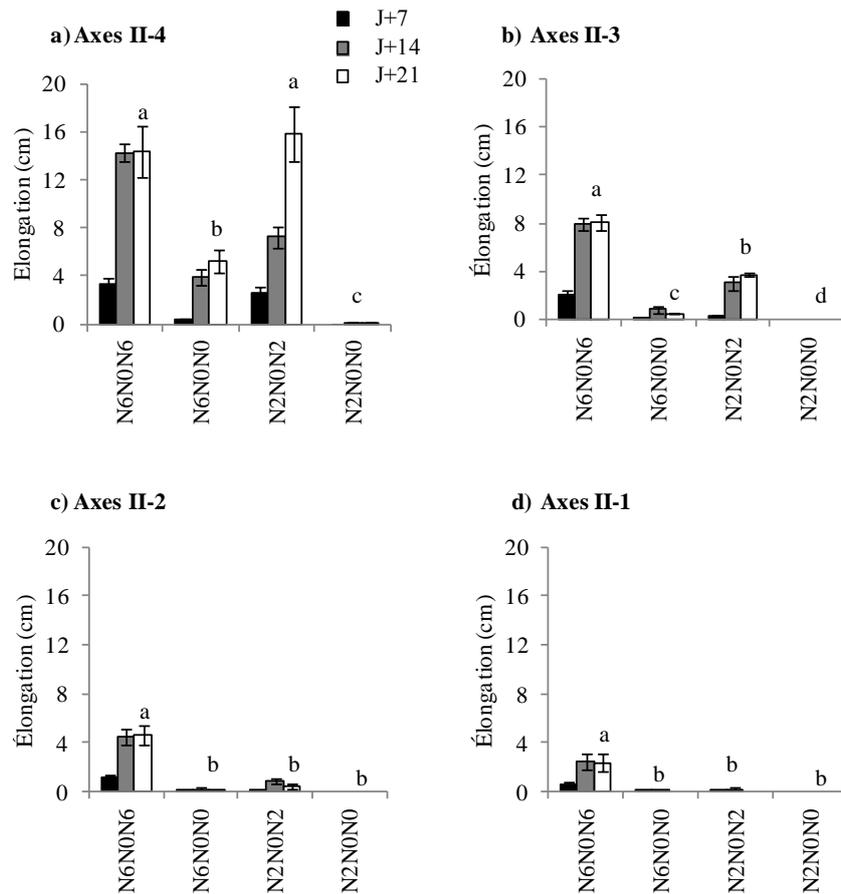
### 1- Architecture des rosiers en réponse à la disponibilité du nitrate

Tous les bourgeons sont capables de débourrer le long de l'axe I et de produire un axe II après la décapitation chez des rosiers arrosés tout au long de leur culture avec une solution nutritive riche en nitrate (12 mM, Figure 26). L'allongement des axes II, la biomasse fraîche et la teneur en azote sont plus importants pour l'axe II-4 une semaine après la décapitation (J+7, élongation de 3,7 cm, Figure 26a; biomasse sèche de 13,8 mg, Figure 26b; teneur en azote de 0,6 mg, Figure 26c). Elles sont plus faibles dans les axes II plus basaux. Les valeurs mesurées pour l'axe II-1 sont les plus faibles : 0,8 cm, 6,6 mg et 0,2 mg respectivement (Figure 26a-c).

L'ensemble des bourgeons de l'axe I débourrent et produisent un axe II également en réponse au traitement N6N0N6 (Figures 21 et 27). Le phénotype est très similaire à celui obtenu chez des plantes qui ont été arrosées tout au long de leur culture avec une solution nutritive riche en nitrate (12 mM, Figures 21 et 26). Dans ces conditions, l'allongement observé une semaine après la décapitation (J+14) est plus important pour l'axe II-4 que pour les axes II plus basaux (14,3 cm et 2,5 cm pour les axe II-4 et II-1, respectivement, Figure 28), pour une biomasse fraîche cumulée à l'échelle de la plante d'environ 12 g par plante à J+14 (Figure 29a). La croissance des axes II de l'axe I n'a pas évolué entre J+14 et J+21.

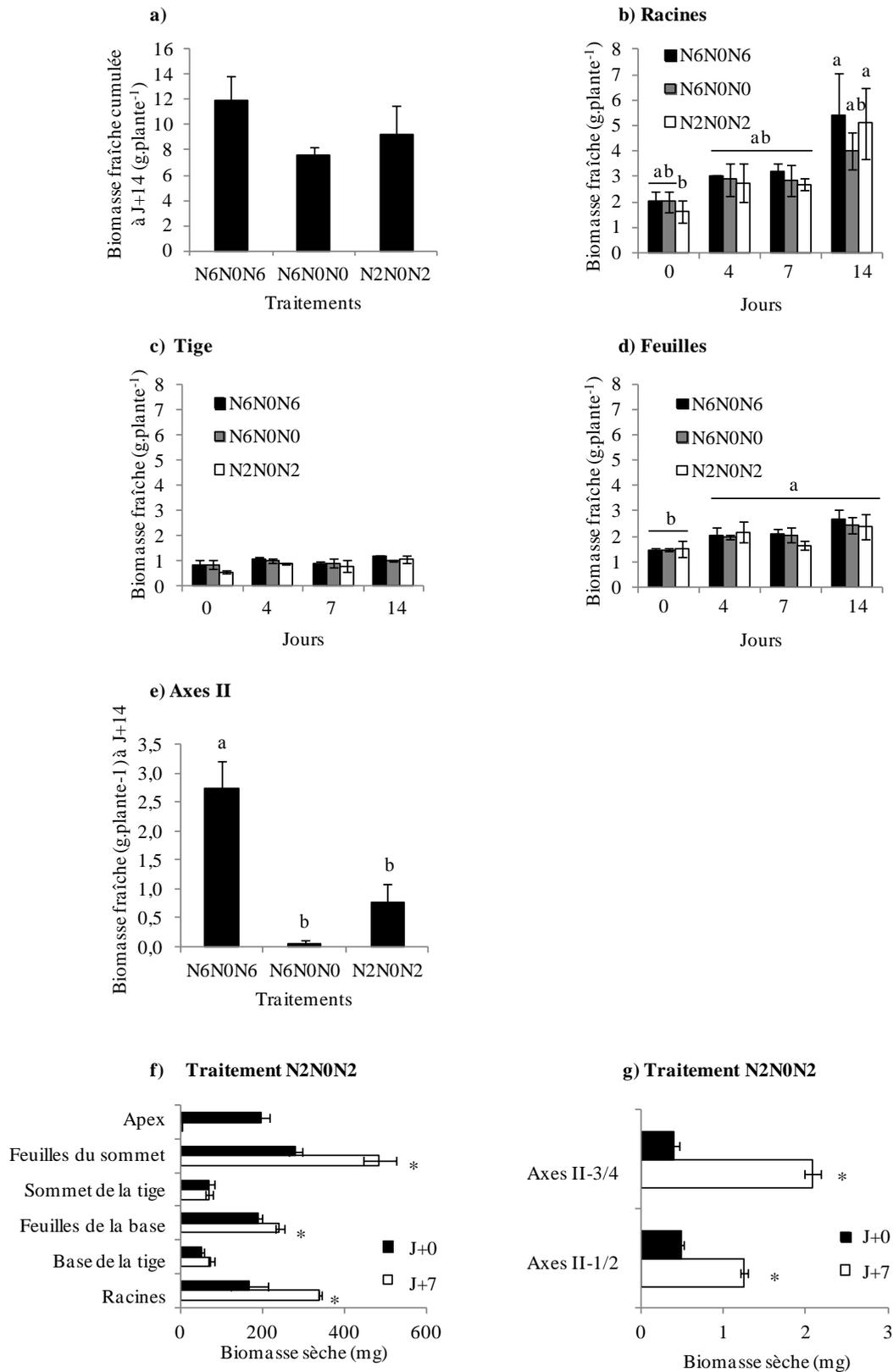
En revanche, lorsque les rosiers subissent une semaine de carence en azote avant la décapitation (traitement N6N0N0, Figure 21), les deux bourgeons les plus apicaux débourrent (Figure 27). La croissance des axes II le long de l'axe I n'a pas évoluée entre J+14 et J+21 (Figure 28). La biomasse fraîche cumulée produite (7,5 g par plante, Figure 29a) est plus basse que pour le traitement N6N0N6, notamment dans les axes II-3 et -4 est significativement plus (Figure 29e).

Les deux bourgeons les plus apicaux (positions II-3 et II-4) débourrent en réponse au traitement N2N0N2 (Figure 21) chez 71,5% des rosiers (Figure 27). Le bourgeon en position II-2 débourre dans 28,5% des cas, mais le bourgeon le plus basal (position II-1) reste toujours dormant. Le bourgeon en position II-2 semble ainsi soumis à une certaine variabilité biologique : l'axe II mis en place présente un allongement moyen faible à J+14 (0,8 cm, Figure 28c). Contrairement aux deux précédents traitements (N6N0N6 et N6N0N0), l'allongement de l'axe II-4 est continu entre J+14 et J+21 (7,3 et 15,9 cm respectivement,



**Figure 28 : élongation des axes II en fonction de leur position le long de l'axe I dans différentes conditions de nutrition en nitrate après décapitation.**

Moyennes de trois expériences indépendantes  $\pm$  les erreurs standards. Les lettres indiquent les différences significatives d'allongement observées à J+21 (barres blanches) pour chaque position d'après les tests de Student et Newman-Keuls,  $p < 0.05$ .



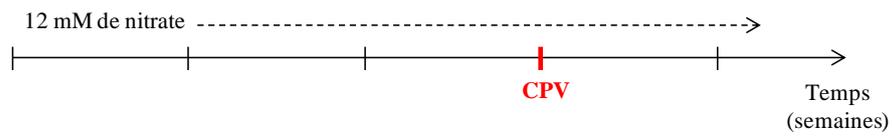
**Figure 29 : biomasses fraîches et sèches dans différentes conditions de culture.**

(a-e) Biomasses fraîches : cumulée par plantes entières à J+14 (a), évolutions entre J+0 et J+14 dans les racines (b), tiges (c), feuilles (d) et axes II (e).

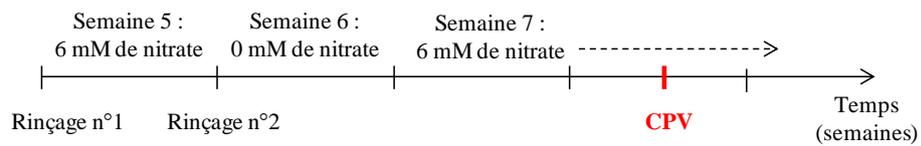
(f-g) Biomasses sèches à J+0 et J+7 : des différents organes (e) et des axes II du sommet et de la base.

Moyennes de trois expériences indépendantes  $\pm$  les erreurs standards. Les lettres ou les étoiles indiquent les différences significatives (tests de Student et Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).

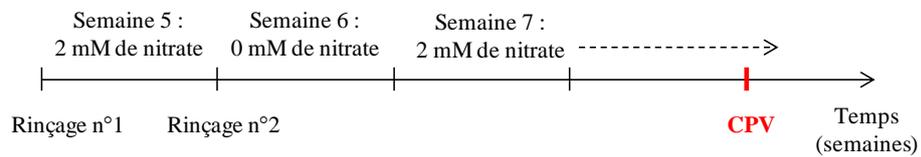
a) **Traitement N12**



b) **Traitement N6N0N6**



c) **Traitement N2N0N2**



**Figure 30 : effets du nitrate sur la date de floraison.**

La survenue de la floraison correspond à l'indication « CPV » (Couleur Pétales Visible).

(a) Traitement N12.

(b) Traitement N6N0N6.

(c) Traitement N2N0N2.

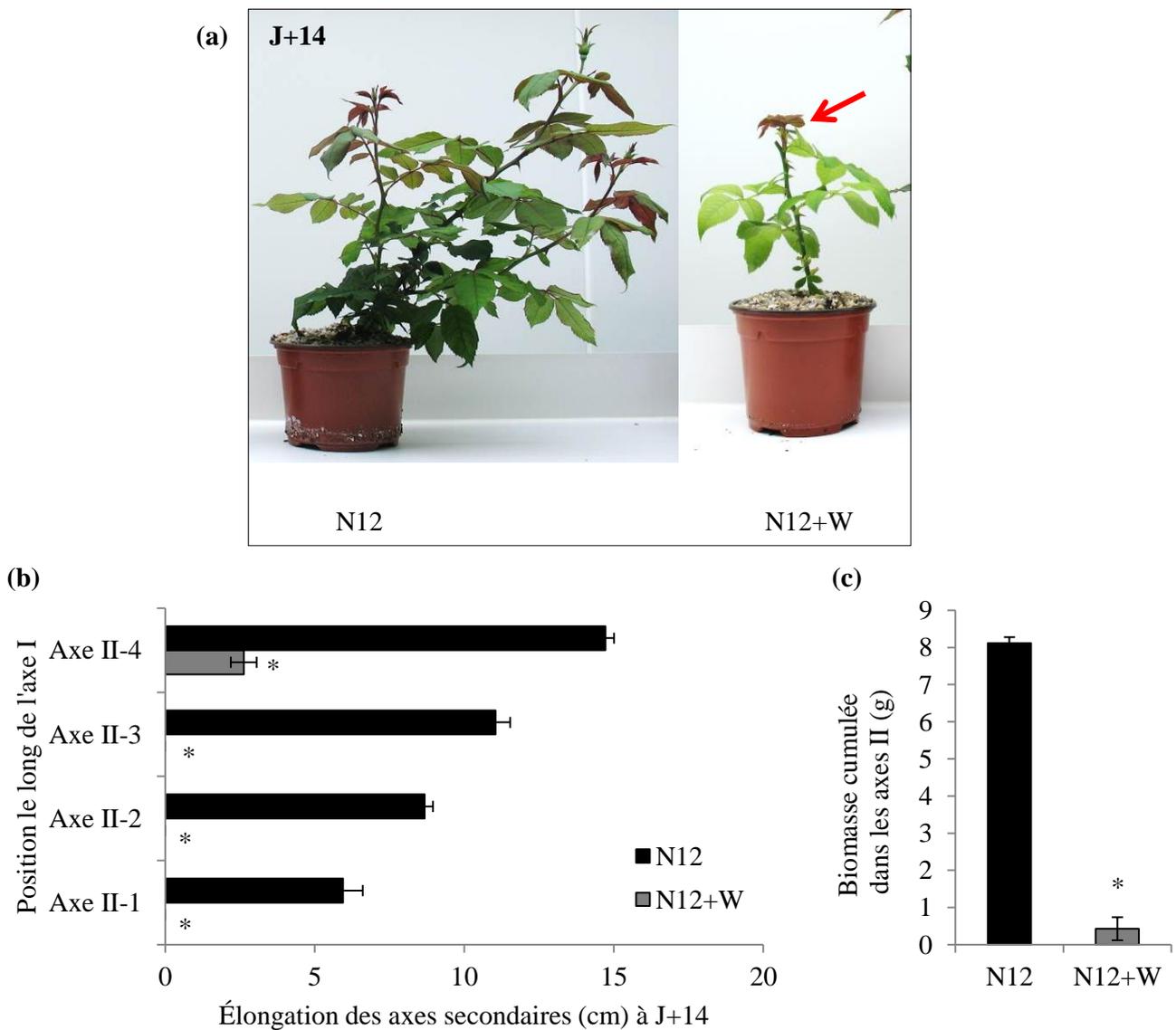
Figure 28a). L'allongement de l'axe II-4 est quant à lui significativement plus élevé que celui de l'axe II-3 (3 cm environ trois semaines après la décapitation, J+21, Figure 28b). La biomasse fraîche cumulée produite dans l'ensemble des plantes sous traitement N2N0N2 au cours des deux semaines d'allongement reste comparable (9,3 g par plante) à celle obtenue en réponse au traitement N6N0N0 (Figure 29a). La biomasse sèche des axes est plus élevée dans les axes II-3 et -4 à J+7 par rapport aux bourgeons dormants de la base de l'axe I (Figure 29g). La biomasse sèche des feuilles est également plus élevée au sommet de l'axe le jour de la décapitation (J+0) et à J+14 par rapport à celle des feuilles de la base (Figure 29f), malgré le fait que les feuilles du sommet soient immatures à J+0.

Seul le bourgeon le plus apical sur l'axe gonfle sans débousser (0,4 cm à J+14, Figure 27) chez plantes ayant subi le traitement N2N0N0. L'apport en nitrate (2 mM, Figure 21) au cours de la semaine de croissance végétative ne permet pas aux bourgeons de débousser.

Les biomasses fraîches des feuilles (environ 3 g par plante, Figure 29d), de la tige (environ 1 g par plante, Figure 29c) et des racines (environ 5 g par plante, Figure 29b) sont identiques à J+14 entre les traitements N6N0N6, N6N0N0 et N2N0N2. Ainsi la majorité de la biomasse produite après la décapitation à l'échelle de la plante entière est investie dans axes II en croissance (Figure 29c).

## 2- La floraison en réponse à la disponibilité du nitrate

Nous avons étudié l'effet de l'apport de nitrate sur la floraison, en réponse aux traitements N12, N6N0N6 et N2N0N2 (Figures 21 et 30). Les plantes atteignent le stade « Couleurs des Pétales Visibles » (CPV) au début de la 8<sup>ème</sup> semaine pour le traitement N12 (Figure 30a), au milieu de la 8<sup>ème</sup> semaine pour le traitement N6N0N6 (Figure 30b) et au début de la 9<sup>ème</sup> semaine pour le traitement N2N0N2 (Figure 30c). L'architecture mise en place à l'issue de la floraison est identique à celle obtenue après décapitation. Cependant, les bourgeons sylleptiques au-dessus du quatrième phytomère ont tendance à produire des axes II courts et rapidement florifères, suggérant que le devenir des axes II se trouve conditionné par la position des bourgeons le long de l'axe I. La couleur de la fleur n'est pas affectée par la disponibilité en nitrate.



**Figure 31 : effet d'apport de tungstate (N12+W) à J+0 sur le phénotype, l'élongation des axes II et la biomasse fraîche produite à J+14 en présence de 12 mM de nitrate.**

(a) Phénotypes de *Rosa hybrida*.

(b) Allongement des axes II en fonction de leur position le long de l'axe I en absence (barres noires) ou présence (barre grise) de 12 mM de tungstate.

(c) Biomasse fraîche cumulée des axes II à J+14 en absence (barres noires) ou présence (barre grise) de 12 mM de tungstate.

Moyennes de trois expériences indépendantes  $\pm$  les erreurs standards. Les étoiles indiquent les différences significatives entre les deux traitements pour un même axe II (test de Student,  $p < 0.05$ ).

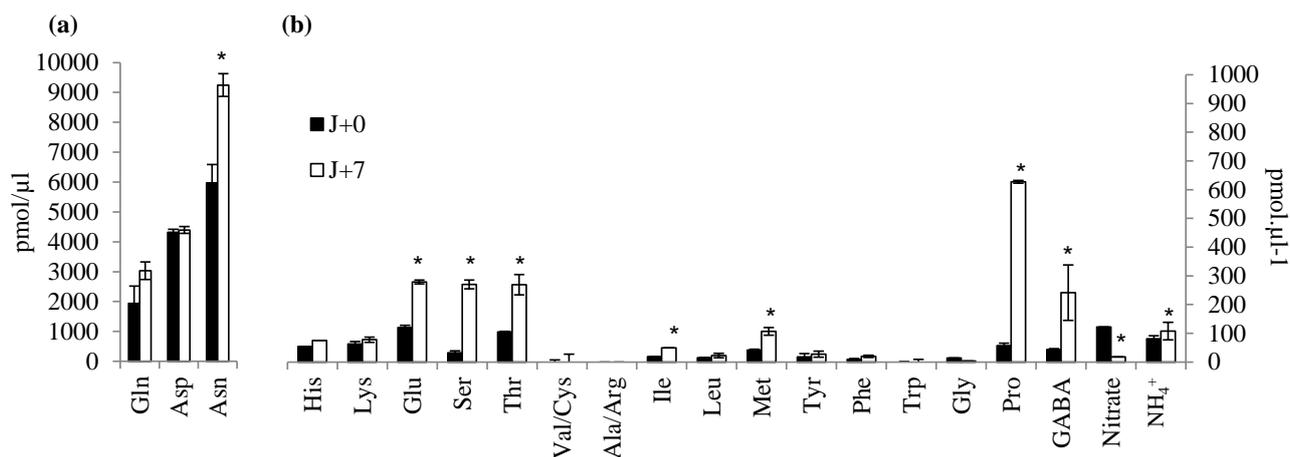
### 3- Effet du tungstate sur l'architecture des rosiers

Le profil de débourrement, l'allongement et la biomasse fraîche à J+14 sont radicalement différents chez les plantes cultivées à partir de la décapitation en présence de 12 mM de tungstate de sodium, un inhibiteur de l'activité Nitrate réductase (traitement N12+W, Figures 21 et 31). Dans ces conditions, seul le bourgeon le plus apical est capable de débousser et de produire un axe II de faible allongement (2,7 cm par rapport aux 14,7 cm observés pour les traitements N12+W et N12, Figure 31a, flèche rouge et Figure 31b). Il en découle que la biomasse fraîche produite à J+14 par l'ensemble des axes II est bien plus faible (baisse de 95%) en présence de tungstate, comparativement à la condition témoin (0,43 g et 8,1 g respectivement, Figure 31c).

## II° Évolution de la composition de la sève au cours du débourrement

### 1- Composition de la sève au cours du débourrement en condition standard

Chez une plante ligneuse telle que le rosier, le nitrate est principalement réduit dans les racines et incorporé sous la forme d'acides aminés. Nous avons donc analysé la composition des exsudats de sèves prélevés au-dessous du phytomère le plus basal de l'axe I majoritairement xylémienne chez des plantes en condition témoin (traitement N12, Figures 21 et 32). La glutamine, l'aspartate et l'asparagine sont les acides aminés prédominants dans la sève avant comme après la décapitation (J+0 et J+7 respectivement, Figure 32a). La suppression de la dominance apicale provoque une augmentation de 55 % de la concentration d'asparagine entre J+0 et J+7 (5974 à 9246 pmol.μL<sup>-1</sup>). En revanche, les concentrations de glutamine et d'aspartate restent similaires entre J+0 et J+7 (3036 et 4350 pmol.μL<sup>-1</sup>, respectivement). Les concentrations des autres acides aminés sont faibles dans la sève avant la décapitation (moins de 200 pmol.μL<sup>-1</sup>; Figure 32b). Les concentrations de certains acides aminés (glutamate, sérine, thréonine, isoleucine, méthionine, proline et GABA) ont significativement augmenté après la décapitation mais restent globalement faibles (voisines de 300 pmol.μL<sup>-1</sup>) sauf celle de la proline qui atteint 630 pmol.μL<sup>-1</sup>. Les concentrations en nitrate et ammonium sont faibles à J+0 (121 pmol.μL<sup>-1</sup> et 80 pmol.μL<sup>-1</sup>, respectivement). La concentration en nitrate a fortement diminué (6,8 fois) après la décapitation alors que celle de l'ammonium a augmenté de 40%, mais reste faible.

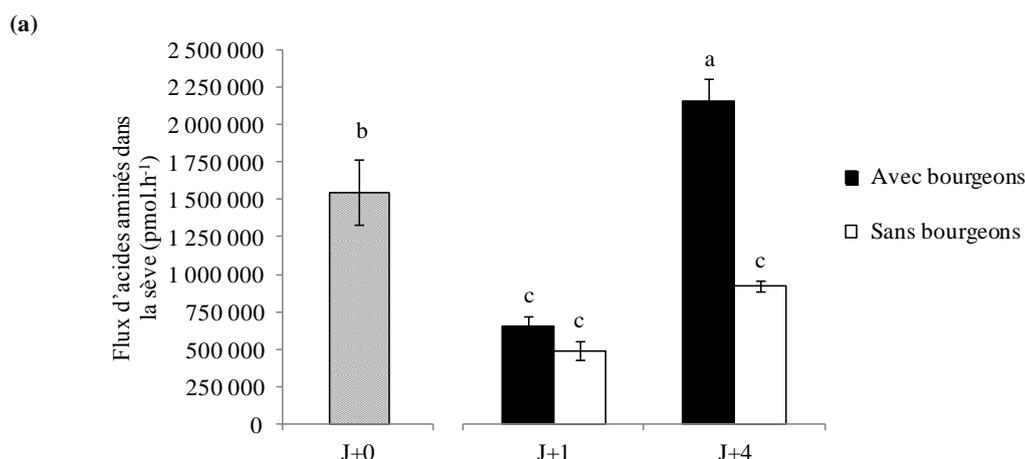


**Figure 32 : concentrations en acides aminés, en nitrate et en ammonium de la sève prélevée au-dessous du phytomère le plus basal sur l'axe I.**

(a) Acides aminés majoritaires.

(b) Acides aminés minoritaires, nitrate et ammonium.

La sève est prélevée à la base de la tige. J+0 : barres noires ; J+7 : barres blanches. Moyennes de trois expériences indépendantes  $\pm$  les erreurs standards (quand elles sont visibles). Les étoiles indiquent les différences significatives (test de Student,  $p < 0.05$ ) entre les valeurs mesurées à J+0 et J+7.



(b)

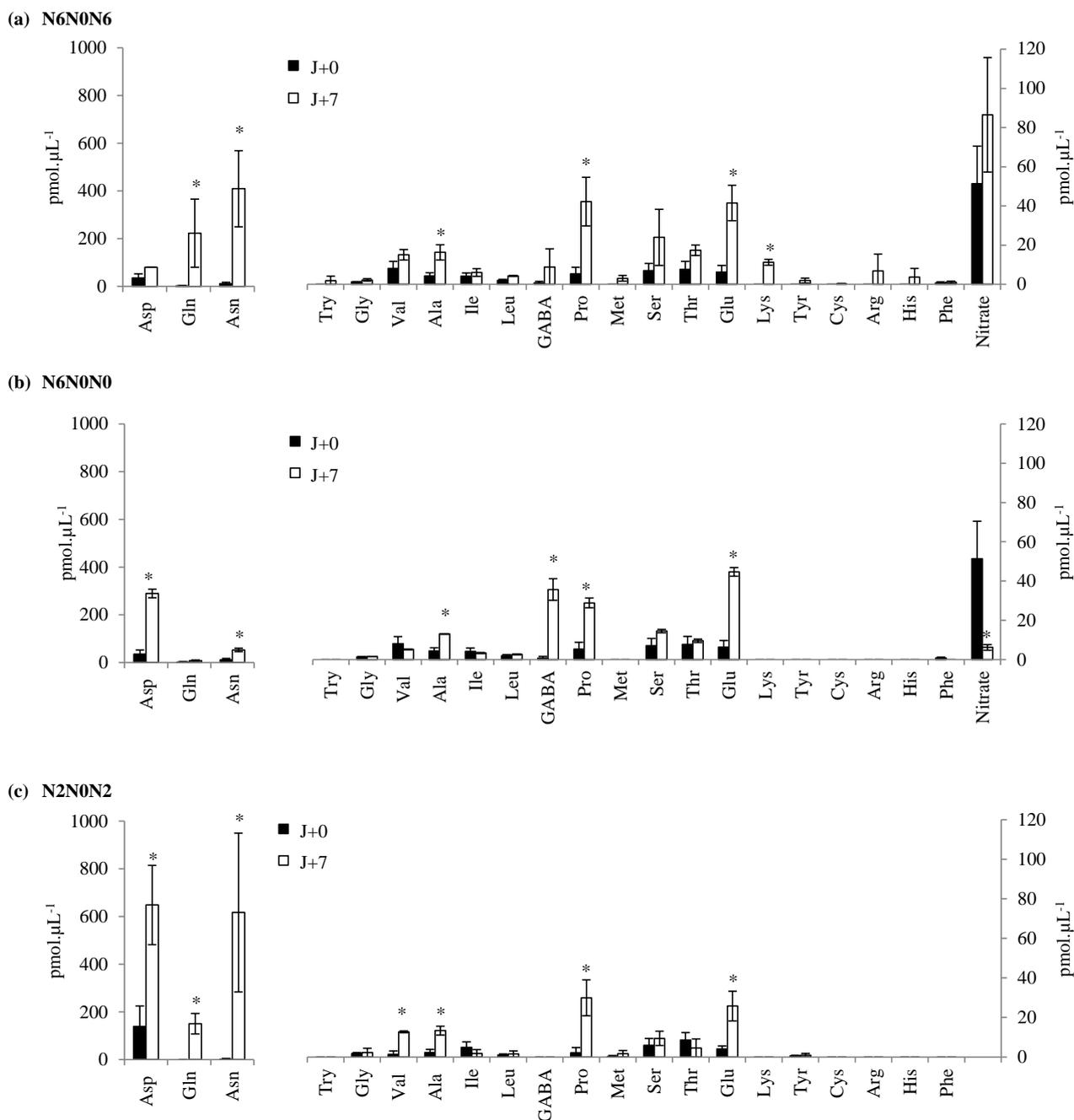
	Concentration (pmol. $\mu\text{L}^{-1}$ )		Débit ( $\mu\text{L.h}^{-1}$ )	
	Avec bourgeons	Sans bourgeons	Avec bourgeons	Sans bourgeons
J+0	16946.8 $\pm$ 2386.0 <b>b</b>		91,3 $\pm$ 15,6 <b>b</b>	
J+1	13893.6 $\pm$ 1350.2 <b>ab</b>	10000.0 $\pm$ 1206.1 <b>a</b>	46,7 $\pm$ 9,1 <b>a</b>	48,7 $\pm$ 23,7 <b>a</b>
J+4	27310.9 $\pm$ 1969.9 <b>c</b>	27030.8 $\pm$ 1102.6 <b>c</b>	78,2 $\pm$ 7,6 <b>c</b>	33,8 $\pm$ 14,2 <b>a</b>

**Figure 33 : flux d'acides aminés dans la sève à J+0, J+1 et J+4 chez *Rosa hybrida* en présence de 12 mM de nitrate.**

(a) Flux d'acides aminés dans la sève (pM/h).

(b) Détails de la concentration (ramenée en  $\mu\text{M}/\mu\text{L}$ ) et du débit ( $\mu\text{L}/\text{h}$ ) qui ont permis d'aboutir au flux d'acides aminés présentés en (a).

La sève est prélevée à la base de la tige. Les bourgeons axillaires sont maintenus (barres noires) ou retirés (barres blanches). Moyennes de trois expériences indépendantes  $\pm$  les erreurs standards. Les lettres indiquent les différences significatives (tests de Student et Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).



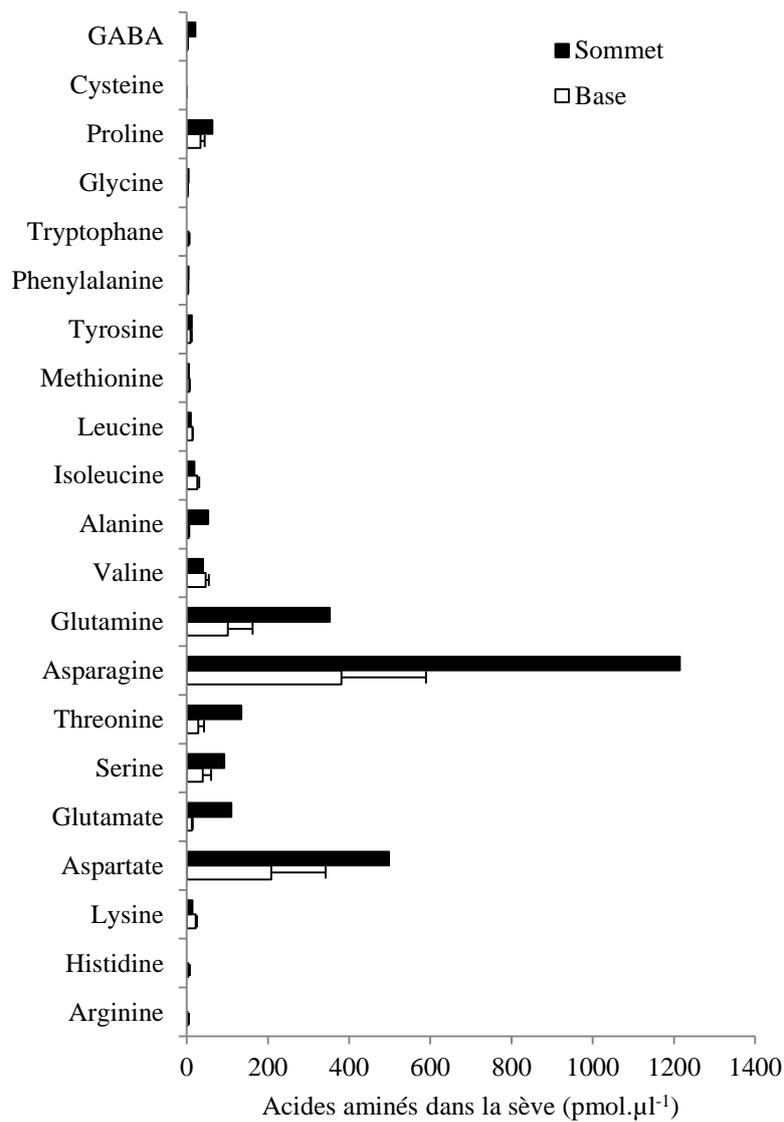
**Figure 34 : concentrations des différentes formes de transport de l'azote dans la sève le jour de la décapitation (J+0) et sept jours après (J+7).**

(a) Traitement N6N0N6.

(b) Traitement N6N0N0.

(c) Traitement N2N0N2.

Gauche : acides aminés majoritaires ; droite : acides aminés mineurs et nitrate. La sève est prélevée à la base de la tige. J+0 : barres noires ; J+7 : barres blanches. Moyennes de trois expériences indépendantes ± les erreurs standards (quand elles sont visibles). Les étoiles indiquent les différences significatives (test de Student,  $p < 0.05$ ) entre les valeurs mesurées à J+0 et J+7.



**Figure 35 : concentrations des acides aminés dans la sève le long de l'axe I à J+14 chez les plantes sous traitement N6N0N6.**

La sève est prélevée à la base (3 répétitions, barres blanches) ou au sommet de la tige (un seul prélèvement sur 4 plantes, barres noires).

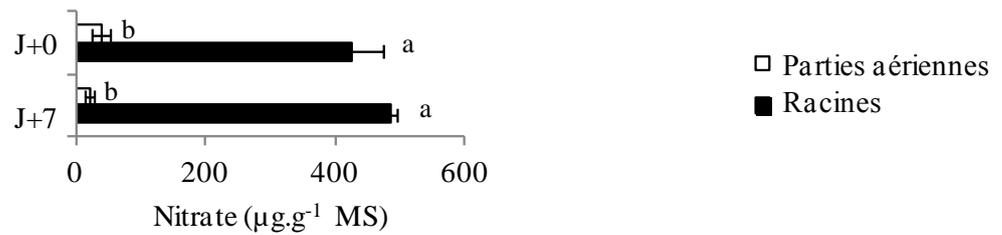
## 2- Évolution du flux d'acides aminés dans la sève au cours du débourrement

Nous avons réalisé une seconde série de prélèvements d'exsudats de sève pour comprendre le rôle joué par l'augmentation de la concentration des acides aminés dans le débourrement des bourgeons, après la suppression de l'apex producteur d'auxine (Figure 33). Nous avons mesuré à la fois le débit de la sève ( $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ , Figure 33c) et sa concentration en acides aminés totaux ( $\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , Figure 33b) avant la décapitation (J+0), puis un jour (J+1) et quatre jours après (J+4) afin de calculer le flux d'acides aminés (Figure 33a). Il diminue de plus de la moitié ( $1,5 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$  à  $0,65 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$ ) 24 heures après la décapitation, puis augmente jusqu'au moins J+4 pour atteindre  $2,1 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$  à J+4. Le flux à J+4 s'explique par une augmentation combinée de la concentration d'acides aminés et du débit de sève. Lorsque les bourgeons sont retirés, la diminution du flux 24 heures après la décapitation est comparable à la situation où les bourgeons sont maintenus, mais aucune augmentation ne survient à J+4. Ce résultat est dû à un faible débit, la concentration en acides aminés étant elle identique à J+4 chez les plantes décapitées avec ou sans bourgeons. La présence des bourgeons semble donc être nécessaire pour que se manifeste cette augmentation, en particulier une augmentation du débit.

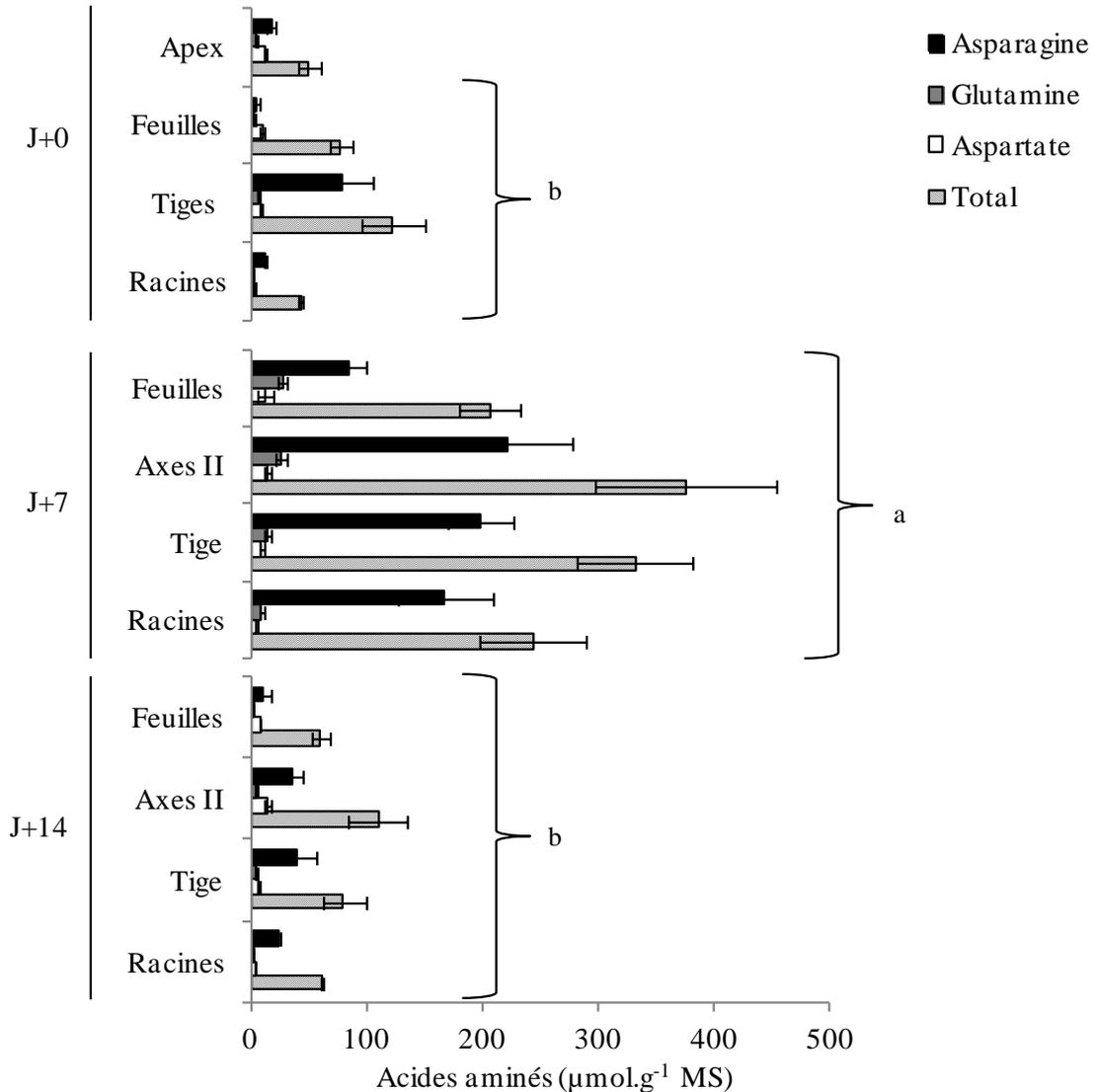
## 3- Composition de la sève en réponse à la disponibilité du nitrate au cours du débourrement

Nous avons souhaité quantifier les variations qualitative et quantitative de la composition de la sève en réponse à la disponibilité du nitrate dans la solution nutritive. Les exsudats de sève ont à nouveau été prélevés au-dessous du phytomère le plus basal de l'axe I (Figure 34). Les concentrations de l'ensemble des acides aminés sont très faibles dans la sève dans le cadre du traitement N6N0N6, de l'ordre de 10 fois moins qu'en réponse au traitement N12 (Figures 32 et 34a). Cela signifie que l'absence de nitrate dans la solution nutritive pendant la semaine de carence provoque une forte baisse de l'exportation d'acides aminés dans la sève et que ceux qui y sont retrouvés à J+0 proviennent essentiellement de la mobilisation des réserves des tissus racinaires et/ou aériens. Les formes d'azote prédominantes à J+7 (Figure 34a) sont l'asparagine ( $409,0 \text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ), la glutamine ( $222,6 \text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ), le nitrate (environ  $70 \text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  à J+0 et J+7), la proline ( $42,2 \text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) et le glutamate ( $41,5 \text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ). Ainsi, les concentrations en glutamine et asparagine augmentent respectivement de 138 fois et 37 fois entre avant la décapitation (J+0) et J+7. Chez les plantes pour lesquelles la carence en nitrate se prolonge au-delà de la décapitation (traitement N6N0N0, Figure 34b), la concentration du nitrate chute de manière nette à J+7 ( $51,46 \text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  à J+0 à  $6,2 \text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ). L'aspartate ( $289,5 \text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ), le glutamate

(a)



(b)



**Figure 36 : teneurs en nitrate et en acides aminés dans différents organes chez *Rosa hybrida* en présence de 12mM de nitrate (traitement N12).**

(a) Teneurs en nitrate à J+0 et J+7, dans les parties aériennes (barres blanches) et les racines (barres noires).

(b) Teneurs en acides aminés totaux (barres hachurées) et majoritaires (aspartate, asparagine et glutamine, barres blanches, noires et grises, respectivement) à J+0, J+7 et J+14.

Moyennes de trois expériences indépendantes  $\pm$  les erreurs standards (quand elles sont visibles). Les lettres indiquent les différences significatives (tests de Student et Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ). En b), la teneur en chacun des acides aminés au sein d'un même organe n'est pas statistiquement différente entre J+0 et J+14, mais diffère de la teneur à J+7.

(44,6 pmol.μL<sup>-1</sup>), le GABA (35,7 pmol.μL<sup>-1</sup>) et la proline (28,8 pmol.μL<sup>-1</sup>) restent les acides aminés prédominants dans la sève à la sortie des racines, une semaine après la décapitation (J+7).

Nous avons ensuite étudié les concentrations des acides aminés présents dans la sève chez les plantes sous traitement N2N0N2 (Figure 34c). L'acide aminé dominant à J+0 est l'aspartate (200,4 pmol.μL<sup>-1</sup>). À J+7 en revanche, la concentration de plusieurs acides aminés a augmenté : l'aspartate (648,3 pmol.μL<sup>-1</sup>), l'asparagine (616,7 pmol.μL<sup>-1</sup>), la glutamine (150,5 pmol.μL<sup>-1</sup>), le glutamate (25,7 pmol.μL<sup>-1</sup>) et la proline (29,9 pmol.μL<sup>-1</sup>).

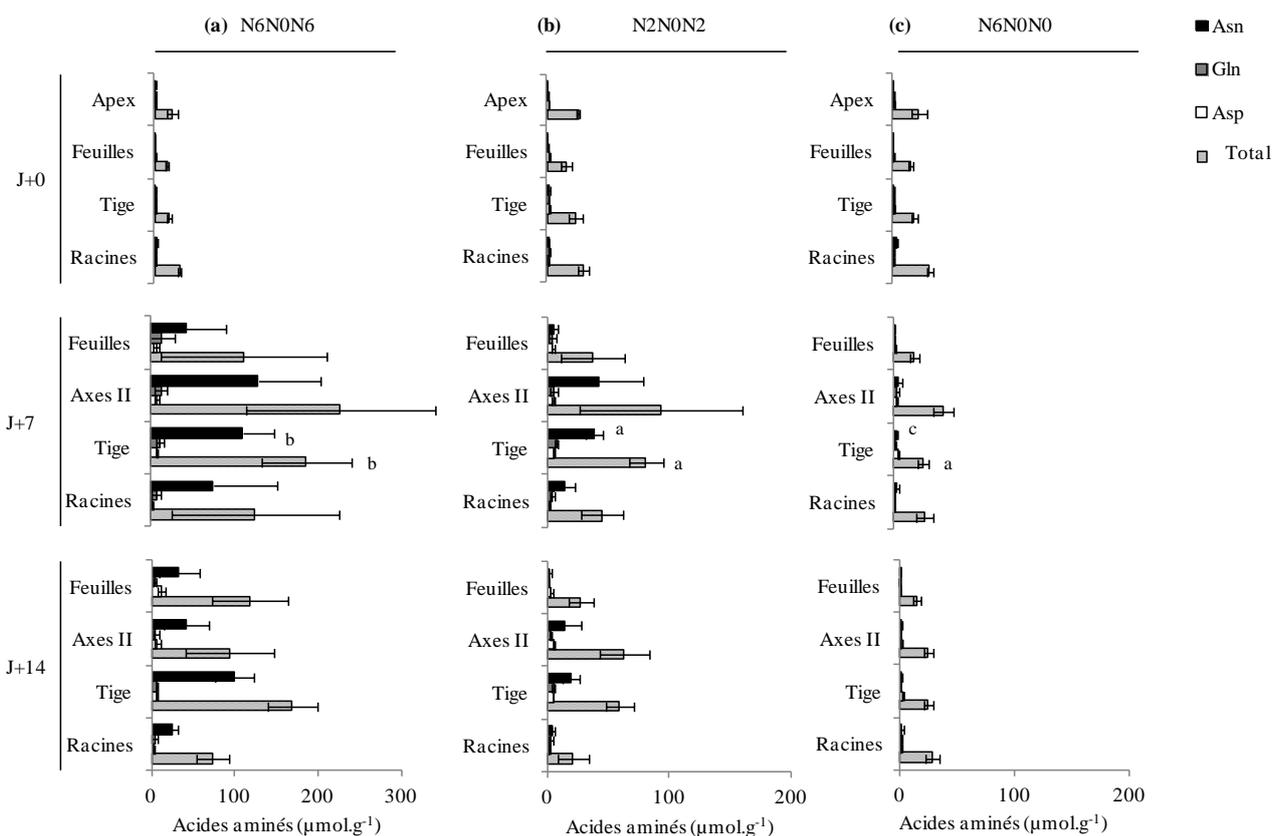
#### 4- Composition de la sève le long de l'axe I

Le prélèvement de sève au sommet de l'axe s'est avéré techniquement difficile (un seul prélèvement concluant). Nous retrouvons au sommet de l'axe I la même composition en acides aminés que celle de la base (Figure 32). Cependant, les concentrations d'asparagine, de glutamine et d'aspartate sont plus élevées au sommet de l'axe I à J+14 (3,2 fois, 3,5 fois et 2,4 fois respectivement, Figure 35).

### III° Évolution de la composition en azote des tissus au cours du débourrement

#### 1- Teneurs en nitrate et en acides aminés chez les plantes non-carencées

Nous avons étudié l'évolution des teneurs en nitrate (Figure 36a) et en acides aminés (Figure 36b et Annexe IX) dans les tissus de différents organes (apex, feuilles, tige, racines, axes II) prélevés le long de l'axe I chez des plantes en régime N12. Les teneurs en nitrate sont 15 fois plus importantes dans les racines (450 ng.mg<sup>-1</sup> MS) que dans la partie aérienne (30 ng.mg<sup>-1</sup> MS). Elles restent stables après la décapitation (Figure 36a). L'évolution des teneurs en acides aminés sont différentes : elles sont faibles avant la décapitation, puis augmentent significativement la première semaine avant de diminuer au cours de la seconde pour atteindre à J+14 des valeurs similaires à celles observées à J+0 (Figure 36b). L'asparagine est l'acide aminé dont l'augmentation des teneurs entre la décapitation à J+0 et J+7 est la plus importante dans l'ensemble des organes : 2,5 fois dans la tige, 14 fois dans les racines et 17 fois dans les feuilles. Ainsi, tous les organes présentent une nette augmentation du métabolisme de l'azote au cours du débourrement. L'asparagine représente les 2/3 des acides aminés dans les axes II à J+7. La glutamine et l'aspartate (Figure 36b) ainsi que l'arginine, le glutamate et la proline (Annexe IX) atteignent quant à eux 30-50 μmol.g<sup>-1</sup> MS à



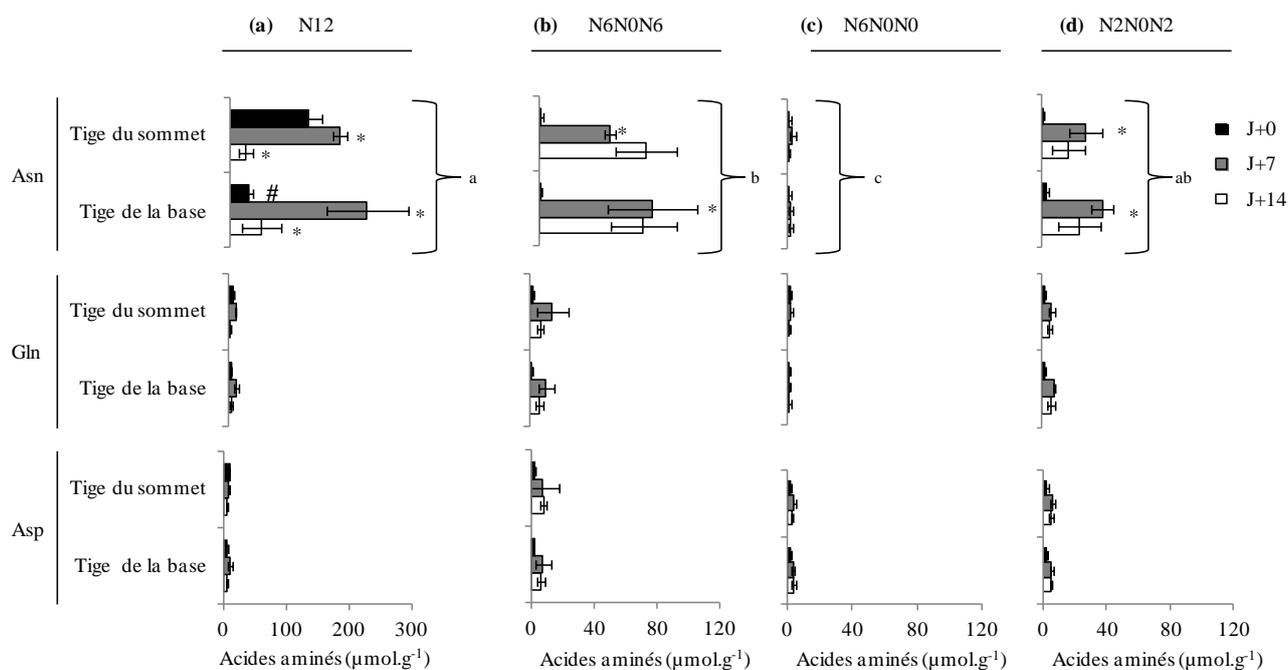
**Figure 37 : teneurs en acides aminés dans les différents organes (apex, feuilles, tige, racines et axes II) chez *Rosa hybrida*.**

(a) Traitement N6N0N6 (avec un axe des abscisses jusqu'à 300  $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ).

(b) Traitement N6N0N0 (avec un axe des abscisses jusqu'à 200  $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ).

(c) Traitement N2N0N2 (avec un axe des abscisses jusqu'à 200  $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ).

Acides aminés majoritaires (aspartate, asparagine et glutamine, barres blanches, noires et grises, respectivement) et totaux (barres hachurées) à J+0, J+7 et J+14. Moyennes de trois expériences indépendantes  $\pm$  les erreurs standards (quand elles sont visibles). Les lettres indiquent les différences significatives entre les trois traitements, aucune différence significative n'ayant été constatée au cours du temps pour chaque traitement (tests de Student et Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).



**Figure 38 : effet du nitrate sur les teneurs en asparagine, glutamine et aspartate au sommet et à la base de la tige.**

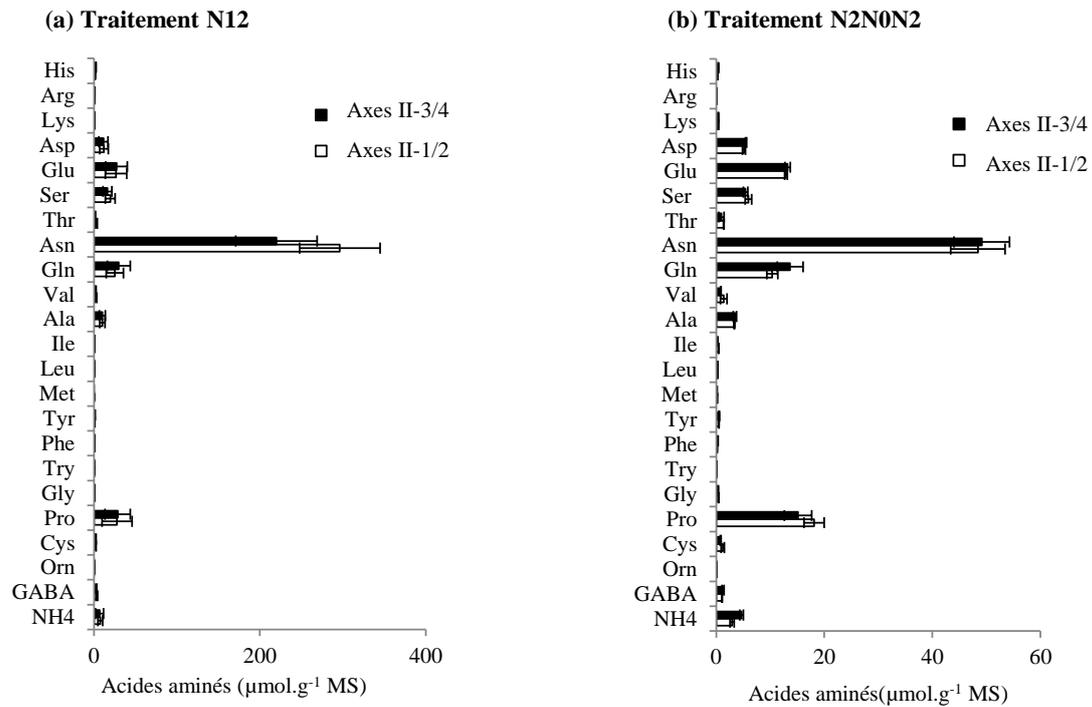
(a) Traitement N12 (avec un axe des abscisses jusqu'à  $300 \mu\text{mol.g}^{-1}$ ).

(b) Traitement N6N0N6 (avec un axe des abscisses jusqu'à  $120 \mu\text{mol.g}^{-1}$ ).

(c) Traitement N6N0N0 (avec un axe des abscisses jusqu'à  $120 \mu\text{mol.g}^{-1}$ ).

(d) Traitement N2N0N2 (avec un axe des abscisses jusqu'à  $120 \mu\text{mol.g}^{-1}$ ).

Les mesures sont réalisées à J+0, J+7 et J+14 (barres noires, grises et blanches, respectivement). Moyennes de trois expériences indépendantes  $\pm$  les erreurs standards (quand elles sont visibles). Les étoiles noires (\*) indiquent les différences significatives entre deux dates successives à une même position. Les dièses (#) indiquent les différences significatives le sommet et la base à une même date (test de Student,  $p < 0.05$ ). Les différentes lettres indiquent les différences significatives entre les traitements (tests de Student et Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).



**Figure 39 : effet du nitrate sur les teneurs en acides aminés et ammonium à J+7 dans les axes II du sommet (3/4) et de la base (1/2) le long de l'axe I.**

**(a)** Traitement N12 (avec un axe des abscisses jusqu'à  $400 \mu\text{mol.g}^{-1}$ ).

**(b)** Traitement N2N0N2 (avec un axe des abscisses jusqu'à  $60 \mu\text{mol.g}^{-1}$ ).

Moyennes de trois expériences indépendantes  $\pm$  les erreurs standards (quand elles sont visibles). Les étoiles indiquent les différences significatives (tests de Student et Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ) entre base et sommet.

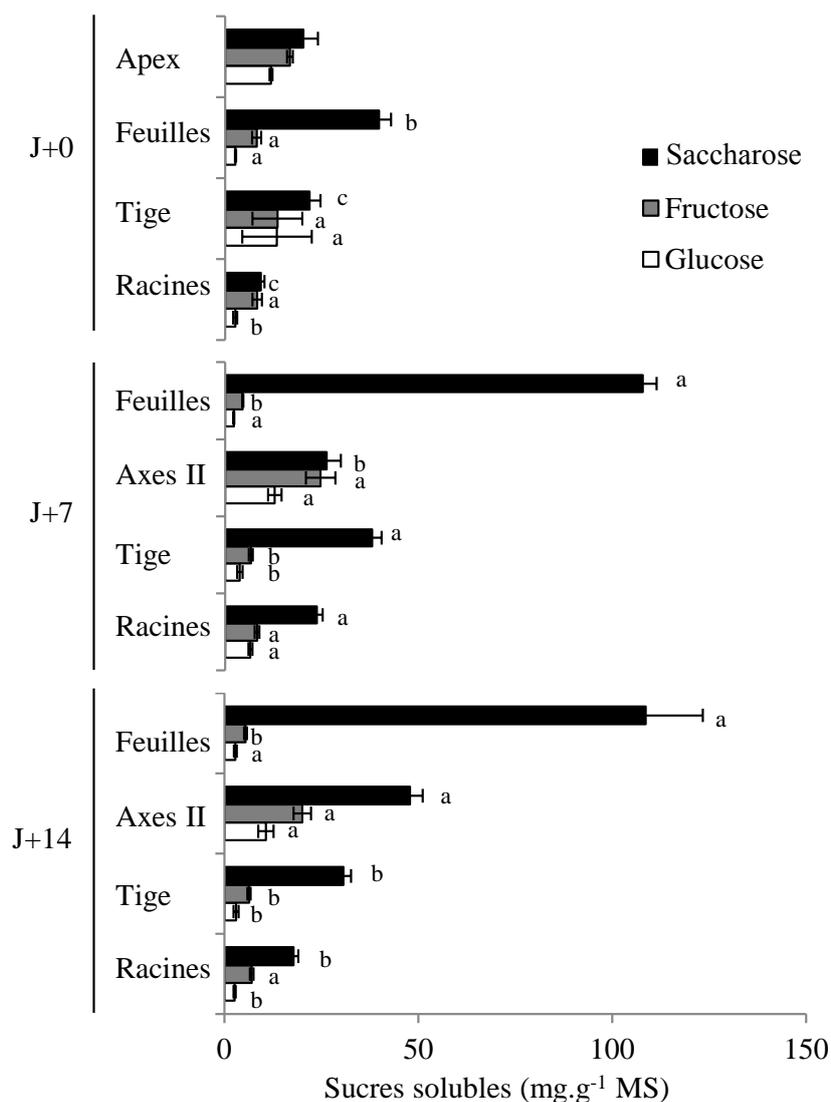
J+7. Cependant, ces teneurs, y compris celle de l'asparagine, diminuent dans tous les organes au cours de la deuxième semaine qui suit l'initiation du débourrement. La teneur en asparagine passe par exemple de  $221 \mu\text{mol.g}^{-1}$  MS à J+7 à  $35 \mu\text{mol.g}^{-1}$  MS à J+14 dans les axes II. Les teneurs des autres acides aminés restent faibles.

## 2- Teneurs en acides aminés en fonction de la disponibilité du nitrate

Les teneurs en acides aminés totaux sont faibles à J+0 (de l'ordre de  $30 \mu\text{mol.g}^{-1}$ ), dans les tissus des différents organes, à l'issue de la semaine de carence imposée dans le cadre des traitements N6N0N6, N2N0N2 et N6N0N0 (Figure 37a, b, c respectivement). Les teneurs en asparagine ainsi que celles de ses précurseurs (glutamine et aspartate) sont présentées en Figure 37, alors que les teneurs des autres acides, stables et très faibles, sont présentées en Annexe X. La teneur en asparagine augmente fortement dans tous les tissus entre J+0 et J+7, et représente environ les deux tiers de l'ensemble des acides aminés des axes II chez les plantes en réponse aux traitements N6N0N6 et N2N0N2 ( $131,7 \mu\text{mol.g}^{-1}$  et  $231,7 \mu\text{mol.g}^{-1}$  respectivement, à J+7, traitement N6N0N6). En revanche, les teneurs en acides aminés totaux restent faibles à J+7 comme à J+14 lorsque la carence stricte se prolonge au-delà la décapitation (traitement N6N0N0). Ces résultats suggèrent qu'un apport de nitrate est nécessaire pour induire une augmentation des teneurs en acides aminés après la décapitation de la plante.

## 3- Évolution de la teneur en acides aminés dans la tige le long de l'axe I

La Figure 38 présente la teneur en asparagine, ainsi que celles de ses précurseurs (glutamine et aspartate) au sommet et à la base de la tige en réponse aux traitements N12, N6N0N6, N2N0N2 et N6N0N0. Les concentrations en glutamine et aspartate dans la base ou le sommet de la tige sont faibles (de l'ordre de  $10 \mu\text{mol.g}^{-1}$ ) durant l'expérience et n'ont pas été associées au débourrement en fonction de la position des bourgeons et à l'allongement des axes II, quel que soit le traitement considéré. Nous constatons que la teneur en asparagine est plus importante à J+0 (3,8 fois) au sommet de la tige par rapport à la base chez les plantes sous traitement N12 ( $125,8 \mu\text{mol.g}^{-1}$  et  $31,6 \mu\text{mol.g}^{-1}$ , respectivement). La semaine de carence stricte en nitrate (Figure 21) imposée dans le cadre des traitements N6N0N6 et N2N0N2 aboutit à J+0 à une baisse drastique des teneurs d'asparagine, de glutamine et d'aspartate dans l'ensemble des organes (Figure 37a,b), qui masque l'éventuel gradient acropète de répartition de l'asparagine mesurée dans la tige en réponse au traitement N12 (Figure 38b-d). Les teneurs



**Figure 40 : teneurs en différents sucres dans les organes (apex, feuilles, tige, racines et axes II) en présence de 12 mM de nitrate.**

Les mesures sont réalisées à J+0, J+7 et J+14 pour le saccharose, le fructose et le glucose (barres noires, grises et blanches, respectivement).

Moyennes de trois expériences indépendantes  $\pm$  les erreurs standards (quand elles sont visibles). Les lettres indiquent les différences significatives pour un organe pour un sucre au cours du temps (tests de Student et Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).

en asparagine à J+7 et J+14 le long de l'axe I sont d'autant plus fortes que la disponibilité en nitrate et l'allongement des axes II sont élevés (Figure 38). Comme 28,5% des plantes sous traitement N2N0N2 présentent un débourrement du bourgeon en position II-2, nous retrouvons une teneur en asparagine conséquente à la base de la tige (Figure 38d). En revanche, les teneurs en asparagine sont très faibles dans le cadre du traitement N6N0N0, où les axes II produisent un faible allongement (Figure 38c).

4- Teneurs en acides aminés dans les axes II le long de l'axe I en fonction de la disponibilité en nitrate

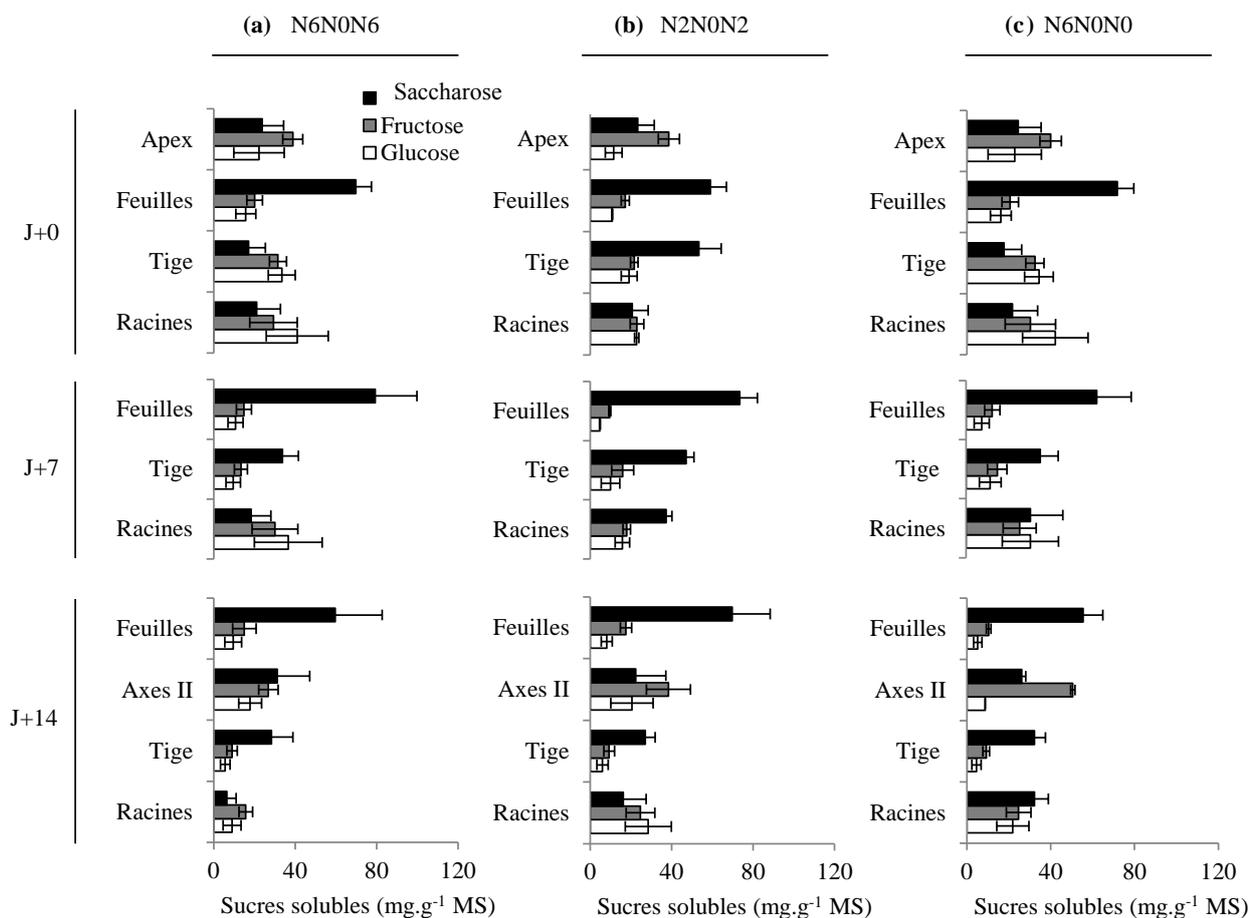
La Figure 39 présente les teneurs des différents acides dans les axes II apicaux (positions -3 et -4) et basaux (positions -1 et -2), en réponse aux traitements N12 et N2N0N2 après une semaine d'allongement (J+7). L'asparagine est majoritaire dans les axes II ( $200 \mu\text{mol.g}^{-1}$  et  $50 \mu\text{mol.g}^{-1}$  à J+7 pour les traitements N12 et N2N0N2, Figure 39, a et b respectivement). Les teneurs des autres acides aminés, bien plus faibles, apparaissent très similaires entre les axes II de la base et du sommet de l'axe I.

#### **IV° Évolution du métabolisme des sucres au cours du débourrement**

1- Teneurs en sucres dans les tissus

a- Teneurs en sucres chez les plantes non-carencées

Nous avons analysé la teneur en saccharose, glucose et fructose dans les tissus (apex, feuilles, tige, racines, axes II) le long de l'axe I (Figure 40), à partir des mêmes échantillons que ceux utilisés pour la précédente analyse des teneurs en acides aminés (Figure 36b). Chez des plantes sous traitement N12, la décapitation a provoqué une forte augmentation de la teneur en saccharose (3 fois) dans les feuilles (de  $38,5 \text{mg.g}^{-1}$  à J+0 à  $107,6 \text{mg.g}^{-1}$  MS à J+7, respectivement) qui est constante entre J+7 et J+14. Les teneurs de glucose et de fructose ont pour leur part diminué dans la tige après la décapitation (de  $13 \text{mg.g}^{-1}$  MS à J+0 à  $6 \text{mg.g}^{-1}$  MS à J+14), alors qu'elles sont restées globalement stables dans les autres organes entre J+7 et J+14 ( $15 \text{mg.g}^{-1}$  MS), notamment dans les axes II en croissance (Figure 40).



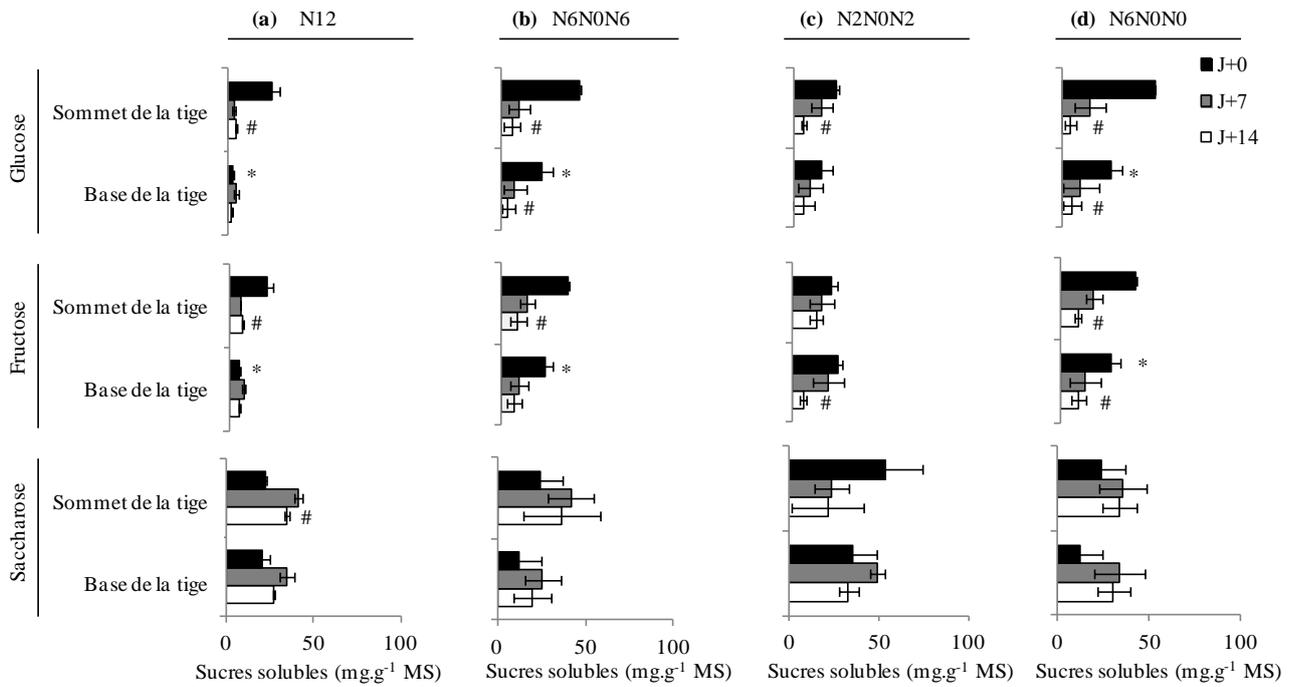
**Figure 41 : effet du nitrate sur les teneurs en différents sucres dans les organes (apex, feuilles, tige, racines et axes II).**

(a) Traitement N6N0N6.

(b) Traitement N2N0N2.

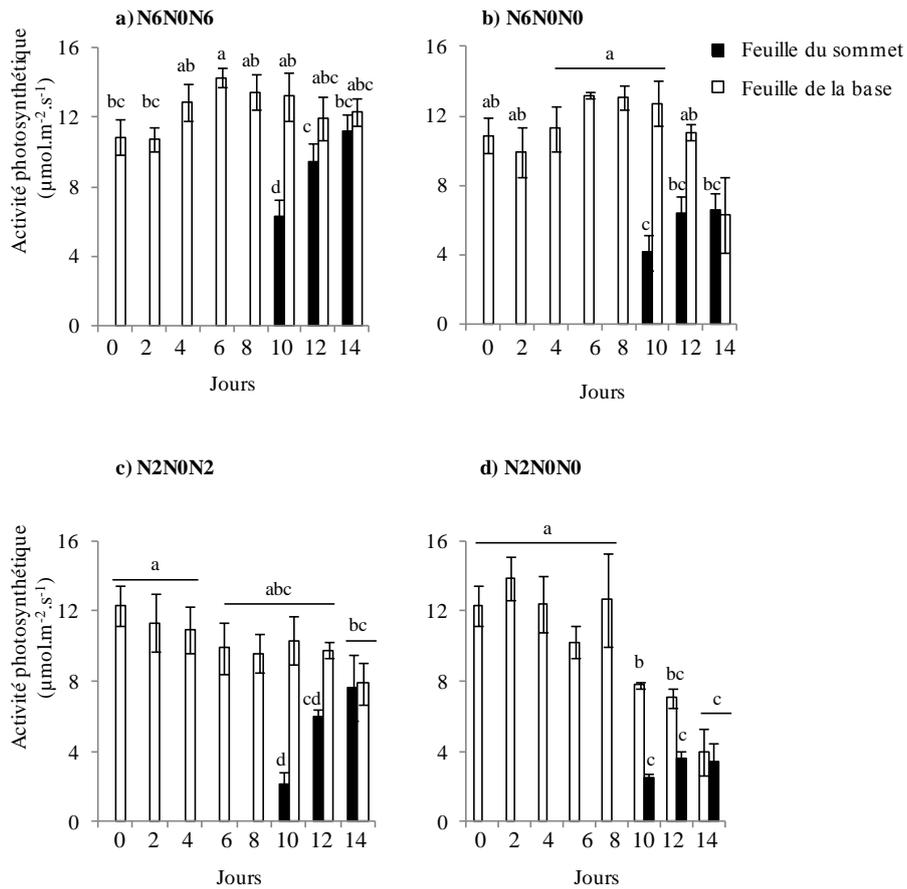
(c) Traitement N6N0N0.

Les mesures sont réalisées à J+0, J+7 et J+14 pour le saccharose, le fructose et le glucose (barres noires, grises et blanches, respectivement). Moyennes de trois expériences indépendantes  $\pm$  les erreurs standards (quand elles sont visibles). L'absence de lettres indique qu'il n'y a pas de différences significatives pour chaque organe pour un sucre au cours du temps et entre les traitements (tests de Student et Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).



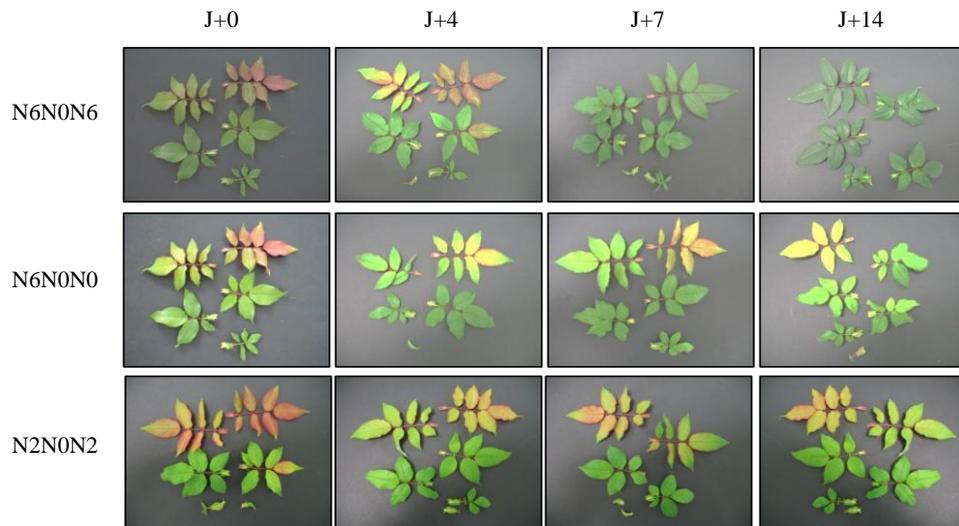
**Figure 42 : effet du nitrate sur les teneurs en sucres au sommet et à la base de la tige.**  
**(a) N12.**  
**(b) N6N0N6.**  
**(c) N2N0N2.**  
**(d) N6N0N0.**

Les mesures sont réalisées à J+0, J+7 et J+14 pour le saccharose, le fructose et le glucose (barres noires, grises et blanches, respectivement). Moyennes de trois expériences indépendantes  $\pm$  les erreurs standards (quand elles sont visibles). Les étoiles (\*) indiquent les différences significatives entre la base et le sommet à J+0, soit avant la décapitation. Les dièses (#) indiquent les différences significatives entre J+0 et J+14 pour une position (tests de Student et Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).



e)

Jours après la fin de la carence et la décapitation (J+0) :



**Figure 43 : effet du nitrate sur l'activité photosynthétique des feuilles de la base et du sommet de l'axe I.**

(a) N6N0N6.

(b) N6N0N0.

(c) N2N0N2.

(d) N2N0N0.

(e) Phénotype des feuilles. Noter la richesse en anthocyanes de la feuille la plus jeune.

Les mesures sont réalisées entre J+0 et J+14. Moyennes de trois expériences indépendantes  $\pm$  les erreurs standards. Les lettres indiquent les différences significatives (test de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ).

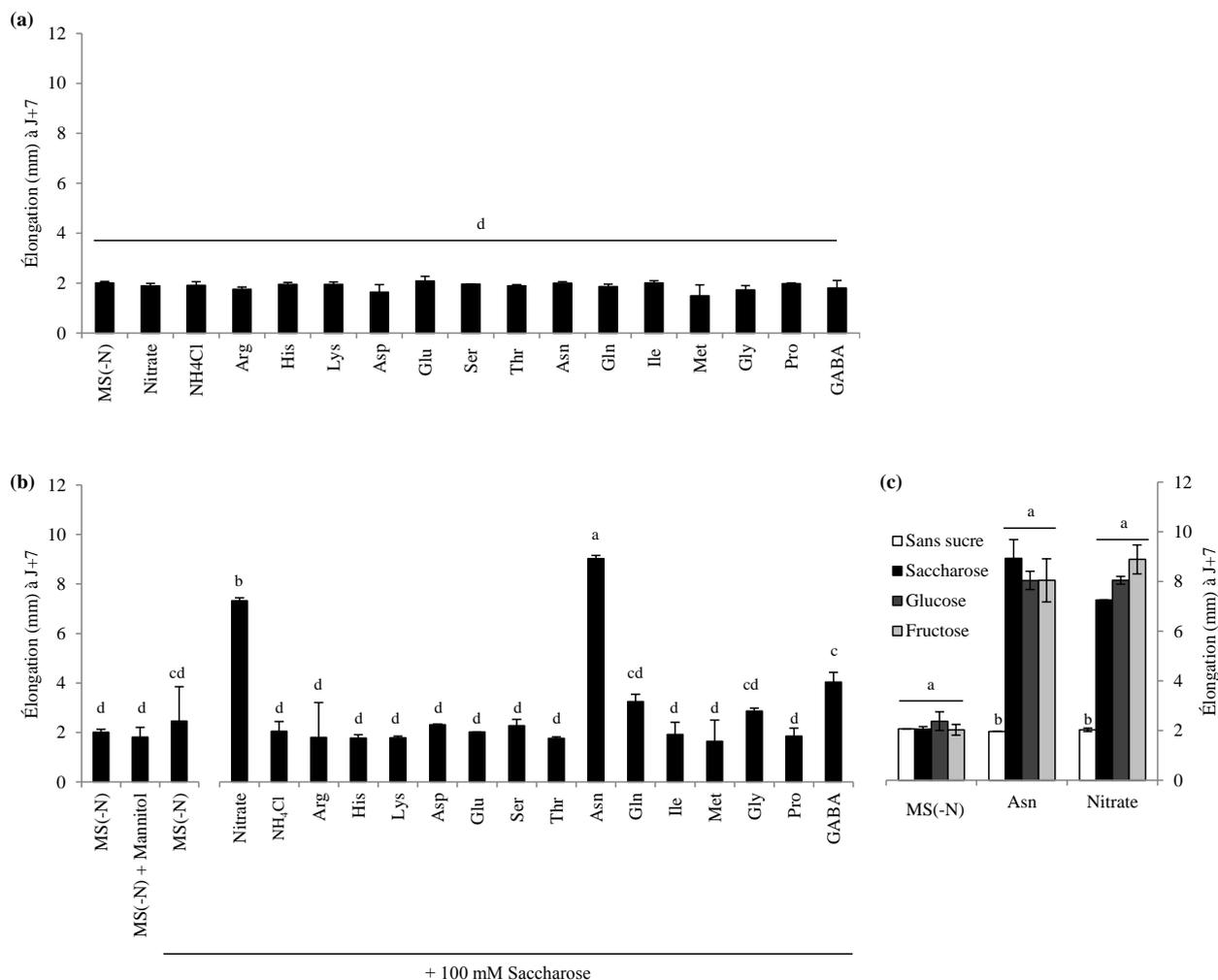
## b- Teneurs en sucres en fonction de la disponibilité du nitrate

Des dosages de la teneur des sucres solubles (saccharose, fructose et glucose, Figure 41) ont été réalisés sur les mêmes échantillons, aux mêmes points de cinétique que ceux de la Figure 37. Le saccharose apparaît prédominant dans les feuilles et reste stable durant l'expérience avant et après la décapitation ( $70 \mu\text{mol.g}^{-1}$  en moyenne entre J+0 et J+14), sans lien avec la disponibilité en nitrate. Le saccharose, le glucose et le fructose ont des teneurs similaires et stables entre J+0 et J+14, de l'ordre de  $30 \mu\text{mol.g}^{-1}$ , dans tous les autres organes et quel que soit le traitement. Deux remarques : i) Les teneurs en saccharose sont, en réponse au traitement N2N0N2, comparables dans les feuilles et dans la tige ( $55 \mu\text{mol.g}^{-1}$  en moyenne à J+0, Figure 41b). ii) Les teneurs en fructose augmentent dans les axes II en allongement à J+14 de manière concomitante avec la baisse de l'apport en nitrate dans la solution nutritive (traitement N6N0N6 :  $26,8 \mu\text{mol.g}^{-1}$ , N2N0N2 :  $38,4 \mu\text{mol.g}^{-1}$  et N6N0N0 :  $50,6 \mu\text{mol.g}^{-1}$ ).

## c- Évolution des teneurs en sucres dans la tige le long de l'axe I

Des dosages de la teneur des sucres solubles (saccharose, fructose et glucose, Figure 42) ont été réalisés sur les mêmes échantillons, aux mêmes points de cinétique que ceux de la Figure 38. Le sommet de la tige présente, avant la décapitation, une teneur en glucose plus importante que la base quelle que soit l'alimentation en azote :  $23,7 \text{ mg.g}^{-1}$  au sommet et  $2,2 \text{ mg.g}^{-1}$  à la base en réponse au traitement N12 (Figure 42a),  $46,6 \text{ mg.g}^{-1}$  au sommet et  $24,7 \text{ mg.g}^{-1}$  à la base en réponse aux traitements N6N0N6 et N6N0N0 (Figure 42b,d), et de manière moins marquée en réponse au traitement N2N0N2 ( $25,3 \text{ mg.g}^{-1}$  au sommet et  $16,6 \text{ mg.g}^{-1}$  à la base, Figure 42c). La même observation s'applique pour le fructose en réponse aux traitements N12 ( $20,8 \text{ mg.g}^{-1}$  au sommet et  $5,4 \text{ mg.g}^{-1}$  à la base), N6N0N6, ( $39,4 \text{ mg.g}^{-1}$  au sommet et  $26,4 \text{ mg.g}^{-1}$  à la base) et N6N0N0 ( $38,5 \text{ mg.g}^{-1}$  au sommet et  $27,3 \text{ mg.g}^{-1}$  à la base). En revanche, ce gradient n'est pas présent en réponse au traitement N2N0N2 ( $20,5 \text{ mg.g}^{-1}$  au sommet et  $24,6 \text{ mg.g}^{-1}$  à la base). Les teneurs en glucose et fructose dans la tige diminuent entre J+0 et J+14 pour l'ensemble des traitements, notamment au sommet de l'axe I.

La teneur en saccharose apparaît homogène dans l'axe I quel que soit le régime de nutrition considéré. La concentration en saccharose augmente significativement au sommet de la tige au cours du temps seulement en réponse au traitement N12 ( $22,0 \text{ mg.g}^{-1}$  MS à J+0 et  $41,0 \text{ mg.g}^{-1}$  MS à J+7), mais reste similaire en réponse au traitement N6N0N6 ( $24,2 \text{ mg.g}^{-1}$



**Figure 44 : effet du saccharose sur l'allongement des bourgeons médians cultivés *in vitro* sur un milieu de base complétement par différentes sources d'azote (10 mM).**

(a) Sans saccharose

(b) Avec saccharose (100 mM)

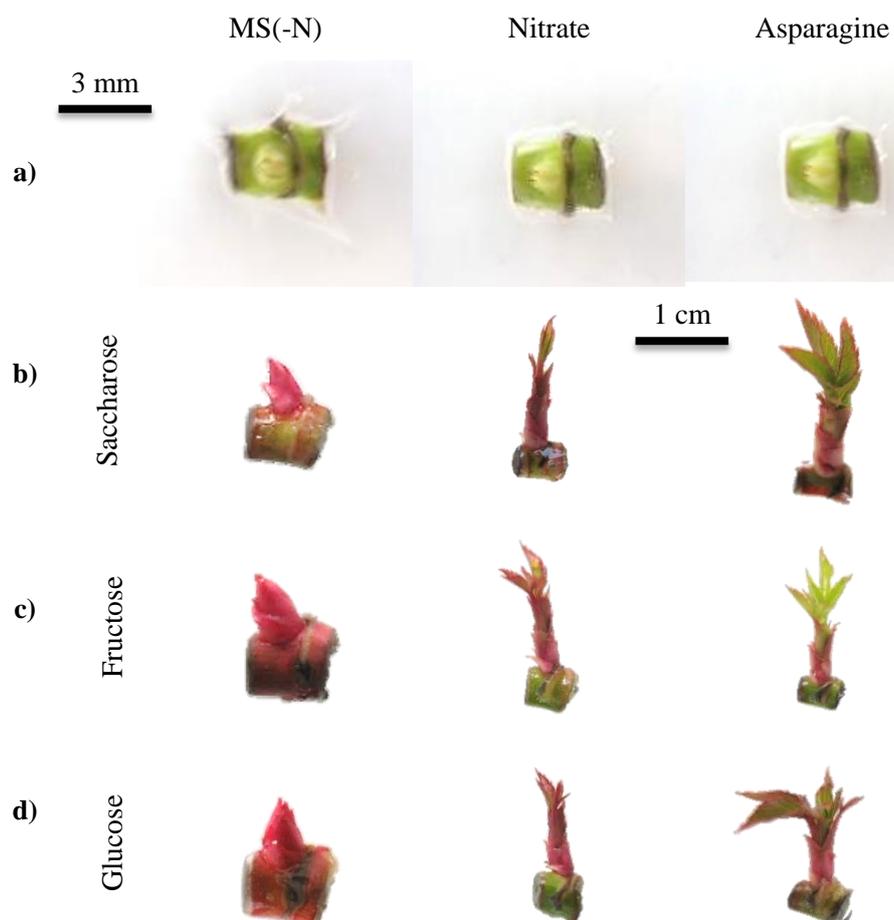
(c) Avec saccharose, fructose ou glucose (100 mM) en présence d'asparagine ou de nitrate.

L'allongement est mesuré à J+7 ; le mannitol (100 mM) est utilisé comme contrôle osmotique. Moyennes de trois expériences indépendantes  $\pm$  les erreurs standards (quand elles sont visibles). Les lettres indiquent les différences significatives (tests de Student et Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).



**Figure 45 : effet de différentes sources d'azote (10 mM ; nitrate, ammonium et acides aminés) sur les phénotypes des bourgeons et jeunes axes II à J+7 cultivés *in vitro* sur un milieu de base en présence ou en l'absence de saccharose (100 mM).**

Les acides aminés sont classés de manière décroissante d'après leur concentration dans la sève des plantes sous traitement N12. Les barres noires indiquent l'échelle.



**Figure 46 : effet de différentes sources d'azote (10 mM, nitrate ou asparagine) et de sucres (100 mM de saccharose, fructose ou glucose) sur les phénotypes des bourgeons à J+7 et jeunes axes II à J+7 cultivés *in vitro* sur un milieu de base.**

- (a) Sans sucre.
- (b) Saccharose.
- (c) Fructose.
- (d) Glucose.

Les barres noires indiquent l'échelle.

<sup>1</sup> MS à J+0 et 41,9 mg.g<sup>-1</sup> MS à J+7), N2N0N2 (53,8 mg.g<sup>-1</sup> MS à J+0 et 23,6 mg.g<sup>-1</sup> MS à J+7), et N6N0N0 (24,2 mg.g<sup>-1</sup> MS à J+0 et 35,6 mg.g<sup>-1</sup> MS à J+7).

## 2- Photosynthèse en réponse à la décapitation et la disponibilité du nitrate

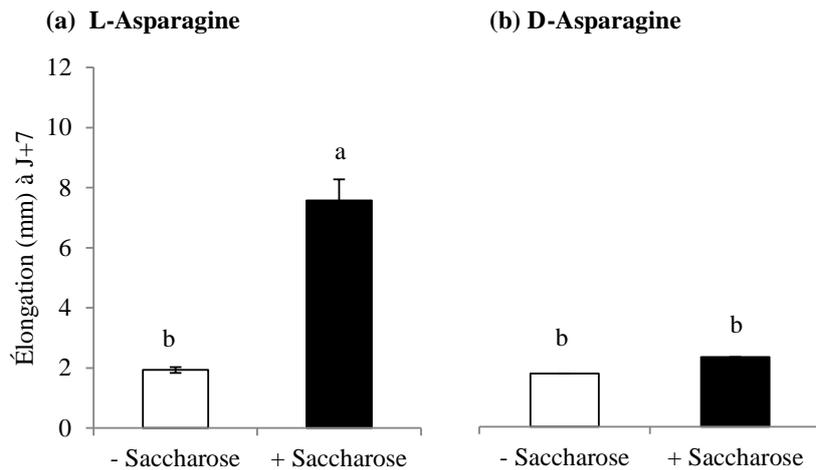
Il existe une relation assez nette entre l'abondance de l'azote et l'activité photosynthétique globale (Figure 43). Un apport élevé en nitrate à la fin de la période de carence (traitement N6N0N6) se traduit par l'activité photosynthétique la plus élevée à J+14 le long de l'axe I (12  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , Figure 43a), par rapport aux autres traitements plus restrictifs en termes de nutrition. En effet, la poursuite de la carence (N6N0N0, Figure 43b) ne montre que peu de différence avec un régime de faible niveau (N2N0N2, Figure 43c, 8  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  environ), ce qui suggère que la plante peut utiliser, en régime N6N0 initial, des réserves accumulées avant les périodes de carence (N6N0N0). En revanche, le traitement initial N2N0 ne permet pas de maintenir une activité photosynthétique élevée lorsque la carence est prolongée (N2N0N0, Figure 43d, 4  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ).

Les feuilles du sommet contribuent de manière limitée au bilan photosynthétique global en raison de leur petite taille au moment de la décapitation (J+0) et ne se prêtent pas à une mesure fiable de l'activité photosynthétique (Figure 43e). C'est pourquoi, la première mesure a été réalisée dix jours après la décapitation (J+10), où l'activité photosynthétique des feuilles du sommet s'établit à 6,3  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , 4,1  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , 2,2  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  et 2,5  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  en réponse aux traitements N6N0N6, N6N0N0, N2N0N2 et N2N0N0 respectivement. Elles atteignent à J+14, quel que soit le traitement considéré, les valeurs des feuilles plus âgées de la base. Ces dernières conservent une activité photosynthétique élevée seulement lorsque le nitrate est abondant dans la solution nutritive (traitement N6N0N6, 12  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , Figure 43a) alors que dans tous les autres cas, leur activité photosynthétique chute à J+14 lorsque celle des feuilles du sommet augmente.

## V° Implication de l'azote et des sucres dans le débourrement

### 1- Culture *in vitro* de nœuds en présence de sucre et de différentes sources d'azote

Nous avons souhaité étudier l'implication respective du nitrate, de l'ammonium et des acides aminés dans le débourrement des bourgeons axillaires (Figure 44). Nous avons choisi de considérer les bourgeons médians, excisés de l'axe I accompagnés par une portion de tige réduite. Ces bourgeons sont cultivés sur le milieu dépourvu de toute source d'azote selon une



**Figure 47 : importance de la chiralité sur la forme biologiquement active de l'asparagine.**

**(a)** Forme L.

**(b)** Forme D.

L'allongement est mesuré à J+7 sur des bourgeons cultivés *in vitro* en présence de 10 mM d'asparagine (forme L ou D), en présence ou absence de 100 mM de saccharose. Moyennes de trois expériences indépendantes  $\pm$  les erreurs standards (quand elles sont visibles). Les lettres indiquent les différences significatives (tests de Student et Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).

photopériode classique (16h/8h en PAR fort) et leur allongement a été mesuré après une semaine. Aucun débourrement n'est observé en absence de saccharose et d'azote (Figure 44a, à gauche). De même, aucun débourrement n'a lieu lorsque 100 mM de saccharose (Figure 44b, à gauche) ou 10 mM de nitrate, d'ammonium ou d'un autre acide aminé (Figure 44a) sont individuellement ajoutés au milieu de base. Les bourgeons cultivés en présence de saccharose seul gonflent et prennent une teinte rouge dès J+1, mais ne débourent pas, même lorsque la concentration de saccharose est portée à 250 mM (Figure 44b).

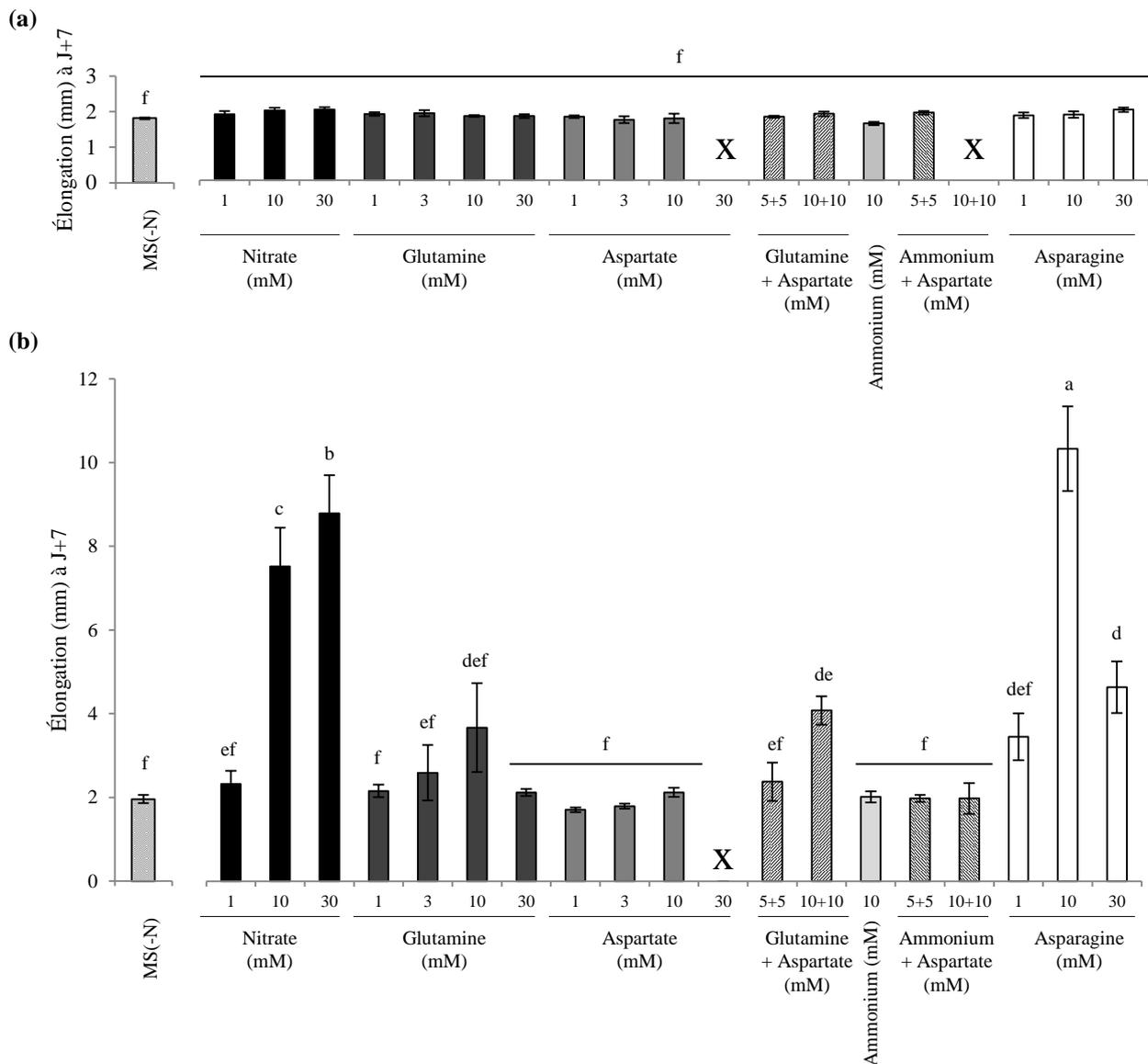
La nature de la source d'azote combinée au saccharose (100 mM) est prépondérante (Figure 44b). En effet, l'ammonium, l'arginine, l'histidine, la lysine, l'aspartate, le glutamate, la sérine, la thréonine, l'isoleucine, la méthionine, la glycine et la proline sont inefficaces à la concentration de 10mM. Seuls le nitrate, la glutamine, l'asparagine et le GABA induisent le débourrement dans ces conditions.

Le débourrement est possible en présence de 10 mM de nitrate et de 100 mM de saccharose. L'axe II produit mesure alors 7,24 mm à J+7. Il n'y a pas de différence d'allongement lorsque le fructose ou le glucose sont substitués au saccharose (Figure 44c). La glutamine ou le GABA (10 mM chacun utilisés en substitution du nitrate), permettent de produire un axe II court, mesurant respectivement 3,2 et 4 mm à J+7.

Seule la L-Asparagine (et pas la D-Asparagine, Figure 47) autorise le débourrement des bourgeons en présence de saccharose, de fructose ou de glucose (Figure 44b,c), et assure un allongement efficace des axes II (environ 9,0 cm à J+7). Il est important de noter que la concentration de 10 mM d'asparagine dans le milieu de culture est une valeur physiologique, qui correspond à la concentration mesurée dans la sève 7 jours après la décapitation (Figure 32), donc durant l'allongement des axes II. Les phénotypes des bourgeons dans les différentes conditions testées à J+7 sont présentés en Figures 45 et 46.

Nous avons ensuite étudié les effets des précurseurs de l'asparagine sur l'allongement lorsqu'ils sont appliqués à leur concentration physiologique mesurée dans la sève (Figure 32) en présence de 100 mM de saccharose sur un nœud cultivé *in vitro* (Figure 48). Les allongements mesurés à J+7 en présence de saccharose et de gammes de concentrations de nitrate, d'asparagine, d'aspartate et de glutamine sont présentés en Figures 49 et 50.

Aucun débourrement n'a lieu en absence de saccharose (Figure 48a), quelle que soit la concentration de nitrate, d'aspartate, de glutamine ou d'asparagine testée (1, 10 ou 30 mM). La

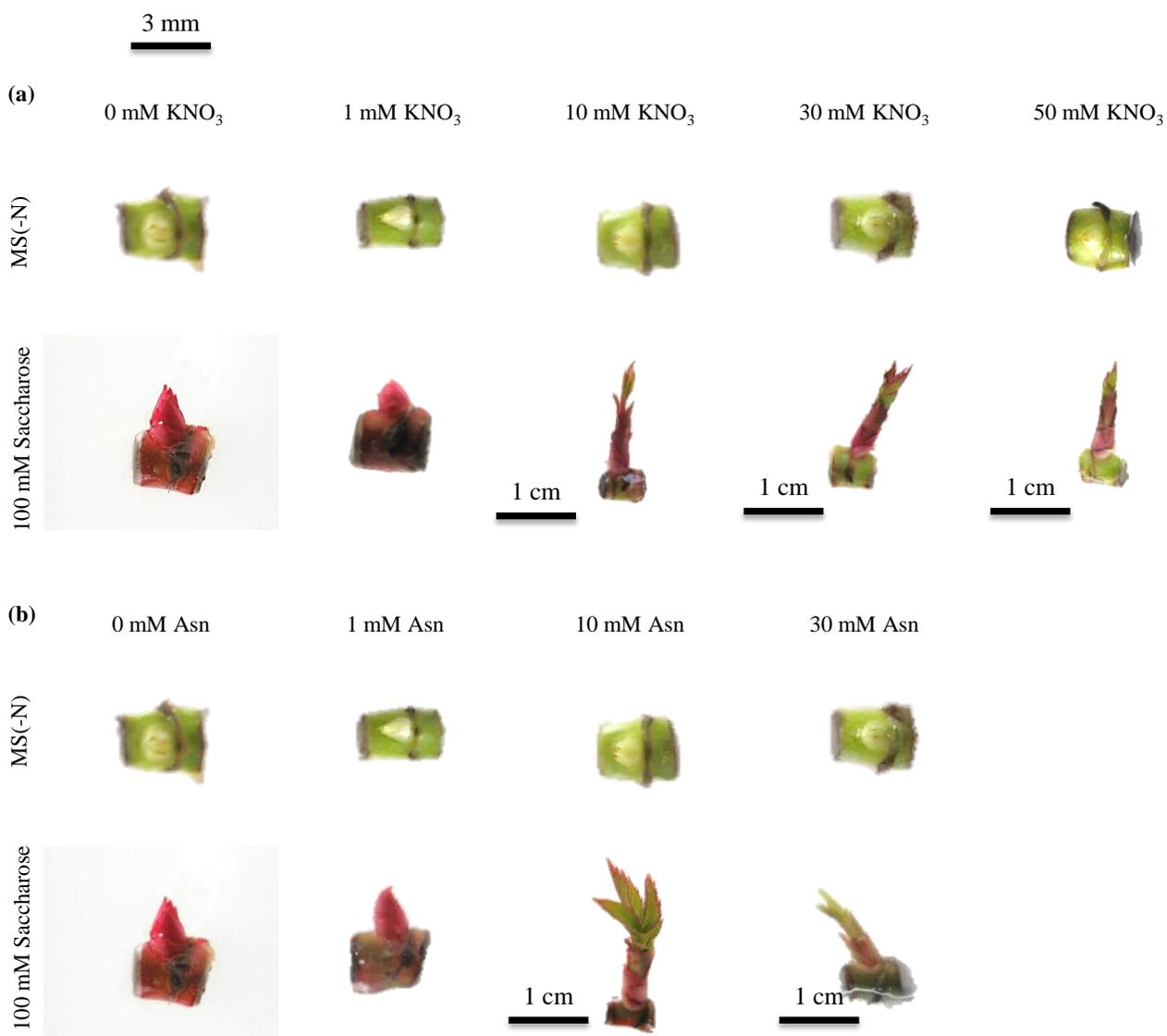


**Figure 48 : effet de différentes sources d'azote à différentes concentrations sur l'allongement des bourgeons médians cultivés *in vitro* sur un milieu de base.**

**(a)** Sans saccharose.

**(b)** En présence de 100 mM de saccharose

Les mesures sont réalisées en absence (MS(-N)) ou en présence de différentes sources d'azote (nitrate, ammonium, aspartate, glutamine et asparagine) aux concentrations indiquées (mM). L'allongement est mesuré à J+7 ; les croix noires indiquent une nécrose des bourgeons. Moyennes de trois expériences indépendantes ± les erreurs standards (quand elles sont visibles). Les lettres indiquent les différences significatives (tests de Student et Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).



**Figure 49** : effet du nitrate ou de l'asparagine sur le phénotype à J+7 des bourgeons ou des jeunes axes II cultivés *in vitro*.

**(a)** Nitrate.

**(b)** Asparagine.

Les bourgeons sont cultivés en présence ou absence de saccharose (100 mM). Les barres noires indiquent l'échelle.

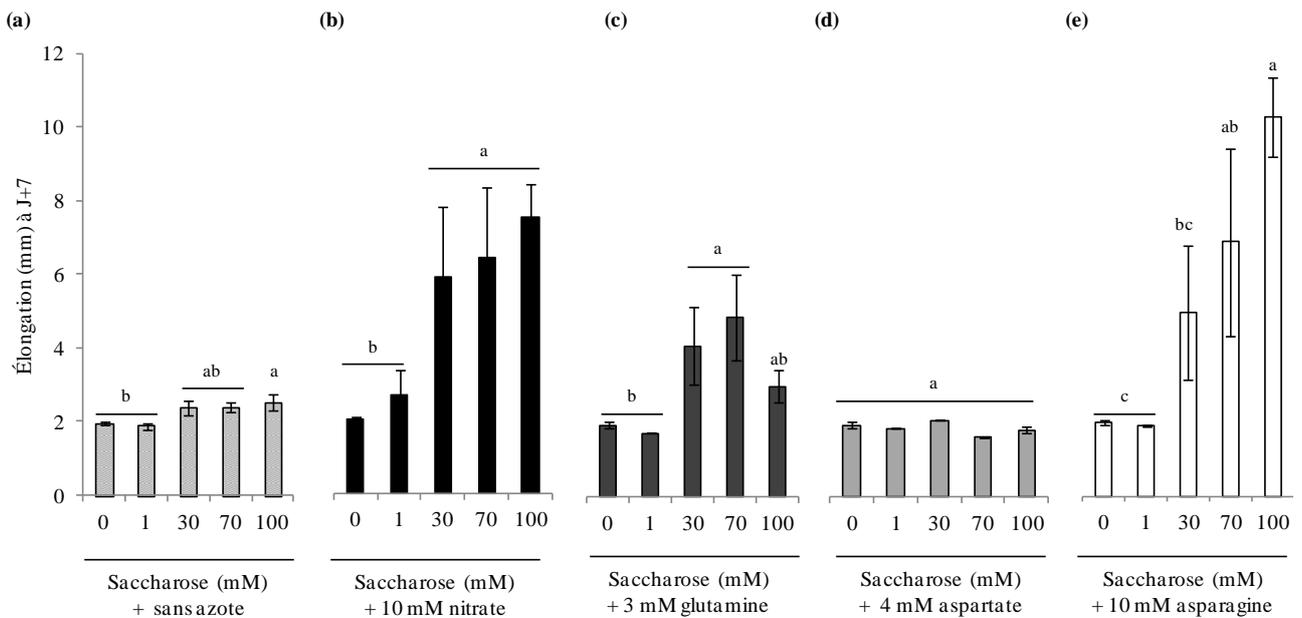


**Figure 50 : effet de la glutamine et de l'aspartate sur le phénotype à J+7 des bourgeons ou des jeunes axes II cultivés *in vitro*.**

(a) Glutamine.

(b) Aspartate.

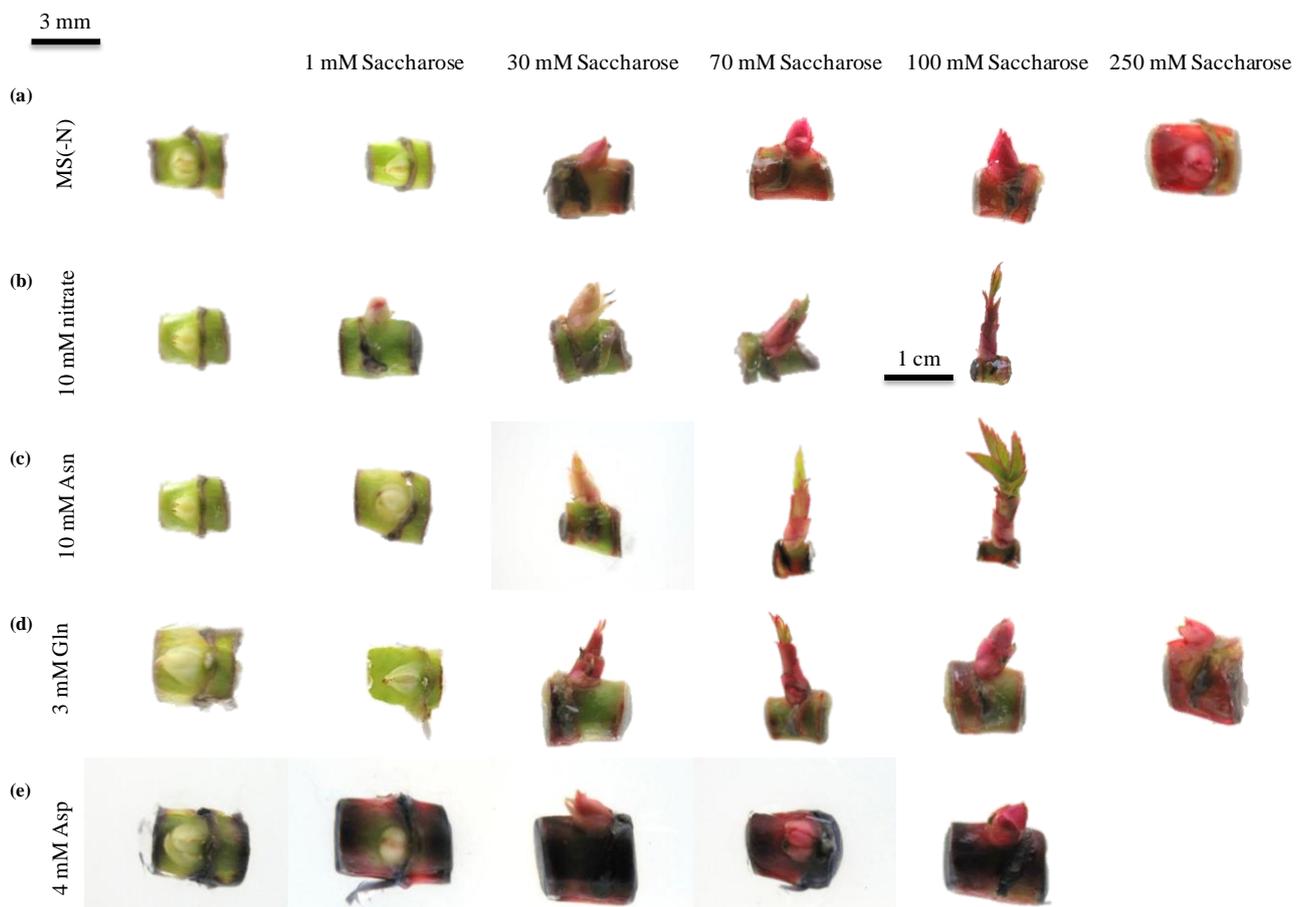
Les bourgeons sont cultivés en présence ou absence de saccharose (100 mM). La barre noire indique l'échelle.



**Figure 51 : effet de diverses sources d'azote aux concentrations physiologiques sur l'allongement des axes II en présence de différentes concentrations de saccharose.**

- (a) Sans azote.
- (b) Nitrate (10 mM).
- (c) Glutamine (3 mM).
- (d) Aspartate (4 mM).
- (e) Asparagine (10 mM).

Les bourgeons sont cultivés en présence de 0-100 mM de saccharose ; l'allongement de l'axe II est mesuré à J+7. Moyennes de trois expériences indépendantes  $\pm$  les erreurs standards (quand elles sont visibles). Les lettres indiquent les différences significatives (tests de Student et Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).



**Figure 52 : phénotypes des bourgeons ou jeunes axes II cultivés *in vitro* sur un milieu de base additionné de différentes sources d'azote aux concentrations physiologiques.**

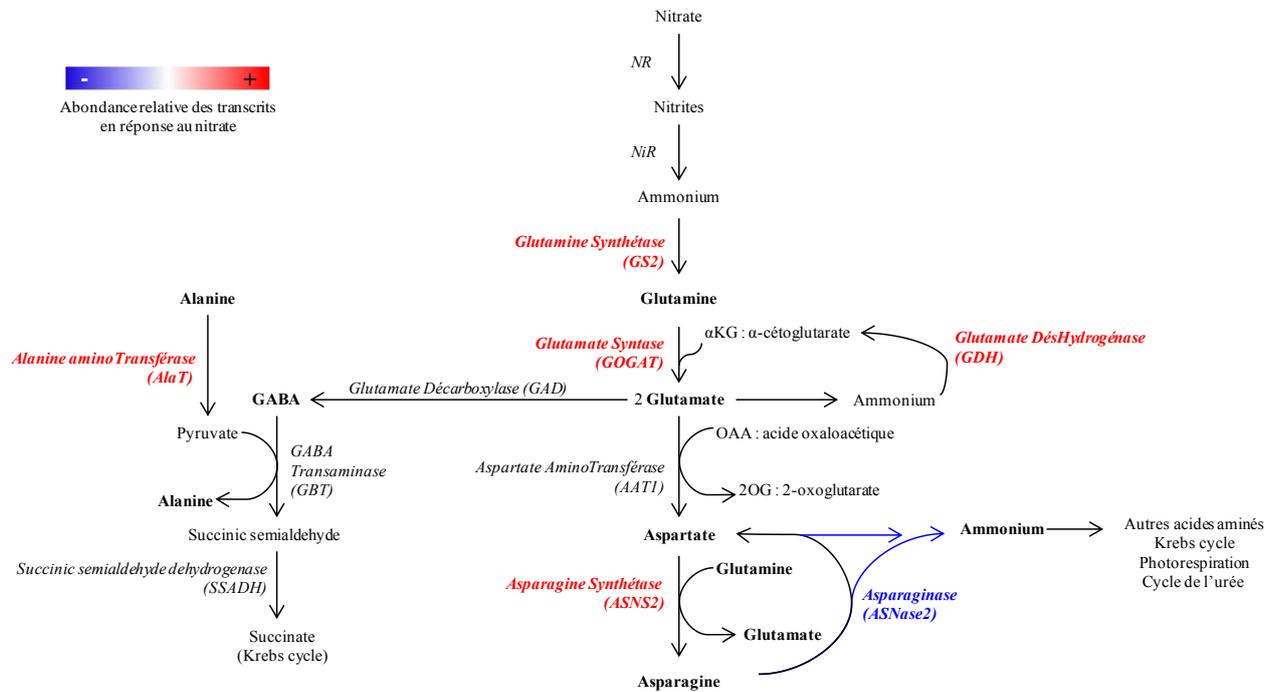
- (a) Sans azote.
- (b) Nitrate (10 mM).
- (c) Asparagine (10 mM).
- (d) Glutamine (3 mM).
- (e) Aspartate (4 mM).

Les bourgeons sont cultivés en présence de 0-250 mM de saccharose ; l'allongement de l'axe II est mesuré à J+7.

présence simultanée de 100 mM de saccharose et de 1 mM de nitrate (concentration supérieure à celle trouvée dans la sève, Figure 48b, à droite) ne permet pas non plus d'initier l'allongement des axes II (Figure 32b, à gauche). En revanche, des concentrations supérieures de nitrate (0 mM ou 30 mM, non-physiologiques) permettent aux axes II de s'allonger efficacement (environ 8 mm à J+7, Figure 48b). La glutamine associée au saccharose reste inefficace à sa concentration physiologique mesurée dans la sève (3 mM à J+7, Figure 16, à gauche). À la concentration de 10 mM, elle induit un faible allongement de l'axe II (3,5 mm à J+7), alors que le débourrement est inhibé si une concentration plus importante (30 mM) est utilisée. Aucune des concentrations d'aspartate testées (1, 10, ou 30 mM, Figure 48b) n'a permis d'initier le débourrement en présence de saccharose et les bourgeons se sont même nécrosés à 30 mM. Comme précédemment indiqué en Figure 44b, l'allongement des axes II est optimum en présence simultanée de saccharose et de la concentration d'asparagine mesurée dans la sève (10 mM, Figure 48b, à droite). De plus, le débourrement des bourgeons s'observe en présence de saccharose également pour des concentrations d'asparagine plus faibles (1 mM, 3,5 mm à J+7, Figure 48b, à droite) ou plus fortes (30 mM, 4,7 mm à J+7, Figure 48b, à droite), mais toujours avec une efficacité plus faible que celle observée pour la concentration physiologique de 10 mM (Figures 44b et 48b).

Nous avons ensuite étudié l'effet de la présence simultanée de saccharose et de deux des trois précurseurs et/ou produits directs de l'asparagine (ammonium, l'aspartate et la glutamine, à 5 ou 10 mM chacun, Figure 48, barres hachurées) sur le débourrement. Aucun débourrement n'a eu lieu en absence de saccharose (Figure 48a, barres hachurées) et lorsque l'aspartate, l'ammonium et le saccharose étaient associés. Cependant, un axe II de petite taille est produit en réponse à la présence simultanée d'aspartate (10 mM), de glutamine (10 mM) et 100 mM de saccharose (4,1 mm à J+7, Figure 48b, barres hachurées). Cet allongement est légèrement supérieur à celui mesuré en réponse à la présence simultanée de glutamine (10 mM) et au saccharose (100 mM, Figures 44b et 48b).

Nous avons également étudié l'effet de différentes concentrations de saccharose sur l'allongement des axes II en présence de différentes sources d'azote (Figure 51). En présence de 10 mM de nitrate, une augmentation de la concentration de saccharose (30 mM à 100 mM) n'a pas d'effet notable sur l'allongement des axes II (environ 7 mm à J+7, Figure 51b). En revanche, le saccharose présente une concentration optimale de 70mM en présence de 3 mM de glutamine (concentration physiologique dans la sève, Figure 32). L'allongement de l'axe II à J+7 est alors de 4,9 mm, Figure 51c). Des concentrations plus importantes d'une de ces



**Figure 53 : variation d'expression des acteurs de la voie de biosynthèse de l'asparagine isolés par l'approche RNAseq.**

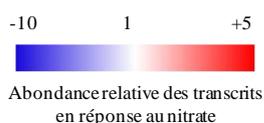
Les variations d'expression des gènes de la voie de biosynthèse de l'asparagine induite par l'apport de nitrate en présence de saccharose sont indiquées en rouge (sur-expression) ou en bleu (sous-expression). Schéma modifié d'après Pratelli *et al.* (2014).

(a) Approche par q-PCR (abondance relative des transcrits – Test par rapport à Réf)

	<i>LDOX</i>	<i>PIP2-1</i>	<i>ASNS2</i>	<i>ASNase2</i>	<i>GS2</i>	<i>PINI</i>	<i>IPT3</i>	<i>TCP11</i>
Réf: 100 mM saccharose	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Test: + 10 mM nitrate	0,40	1,06	3,14	0,14	0,99	0,97	1,23	1,04

(b) Approche par RNAseq (rapport du nombre de reads – Test/Réf)

	<i>LDOX</i>	<i>PIP2-1</i>	<i>ASNS2</i>	<i>ASNase2</i>	<i>GS2</i>	<i>PINI</i>	<i>IPT3</i>	<i>TCP11</i>
Test/Réf	0,50	1,84	4,80	0,30	1,70	1,70	1,90	0,00



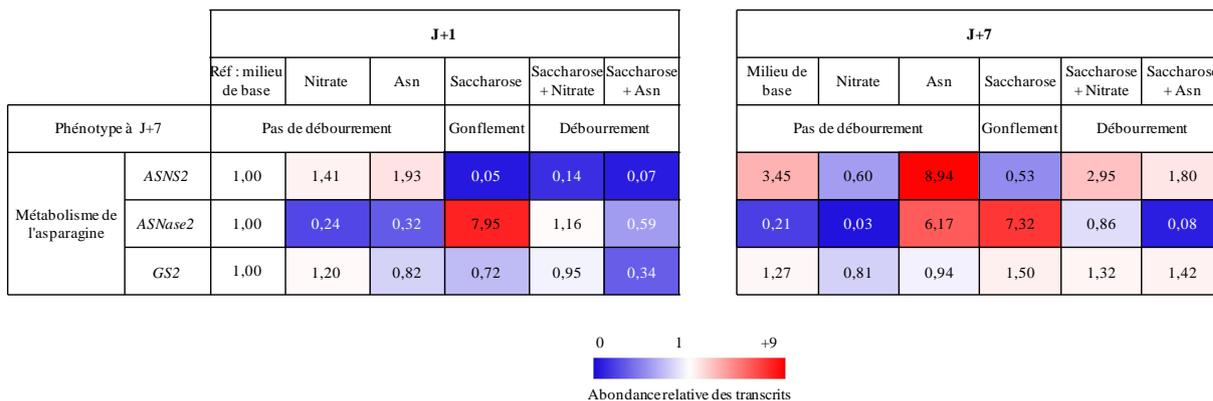
**Figure 54 : effet du nitrate (en présence de saccharose) sur l'abondance relative des transcrits dans les nœuds (tige et bourgeon).**

(a) Approche par q-PCR. Les résultats sont exprimés en prenant la condition «MS(-N)+100 mM de saccharose» comme référence (base 1). Moyennes de trois expériences indépendantes regroupant chacune au moins trois répétitions techniques, soit trois boîtes de Pétri contenant chacune une douzaine de nœuds.

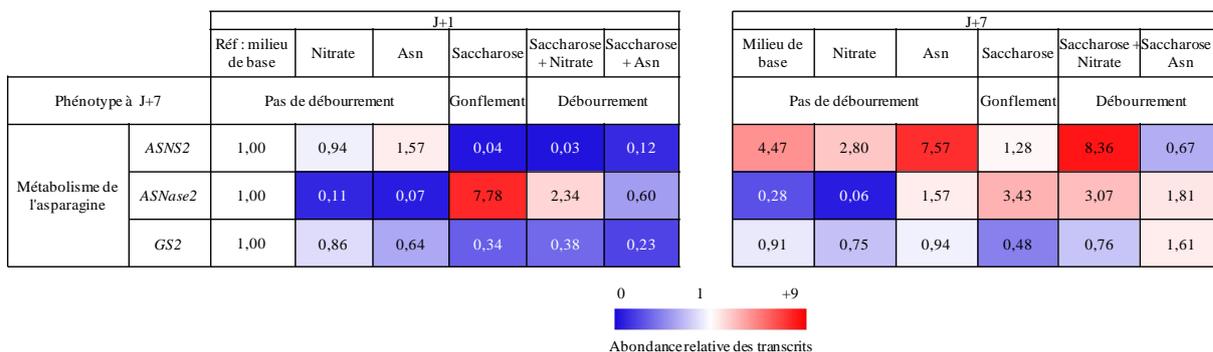
(b) Approche par RNAseq. Les résultats correspondent au rapport du nombre de séquences alignées sur chaque gène dans la condition test et de référence (Réf).

*LDOX* : Anthocyanine synthase (Leucoanthocyanidin dioxygenase), *PIP2-1* : Aquaporine (Plasma membrane Intrinsic Protein), *ASNS2* : Asparagine Synthétase 2, *ASNase2*: Asparaginase, *GS2* : Glutamine synthétase, *PINI* : transporteur d'auxine, *IPT3* : biosynthèse de cytokinines, *TCP11* : facteur de transcription de la famille de BRC1.

**(a) Tige – Référence : MS(-N) à J+1**



**(b) Bourgeon – Référence : MS(-N) à J+1**



**Figure 55 : métabolisme de l'asparagine.**

**(a)** Accumulation des transcrits de *ASNS2*, *ASNase2* et *GS2* dans la tige et phénotype à J+7 des bourgeons.

**(b)** Accumulation des transcrits de *ASNS2*, *ASNase2* et *GS2* dans les bourgeons et phénotype à J+7 des bourgeons.

Les échantillons sont cultivés *in vitro* sur milieu de base (pris comme base 1), ou additionné de 10 mM de nitrate, 10 mM d'asparagine, 100 mM de saccharose (seuls ou en combinaison). Les mesures sont effectuées à J+1 et J+7. Moyennes de trois expériences indépendantes. Les erreurs-standard sont présentées en Annexe XVII.

deux composés (10 mM de glutamine et de 100 mM de saccharose) se traduisent par un allongement moindre des axes II (un millimètre de moins au bout d'une semaine, Figures 44b, 48b et 51b). Le débourrement n'est pas observé en présence de la concentration physiologique d'aspartate (4 mM), quelle que soit la concentration de saccharose dans le milieu de culture *in vitro* (Figure 51d). À la concentration physiologique d'asparagine (10 mM), l'allongement des axes II augmente avec la teneur en saccharose dans le milieu de culture (Figure 51e). Les phénotypes des bourgeons dans les différentes conditions testées à J+7 sont présentés en Figure 52.

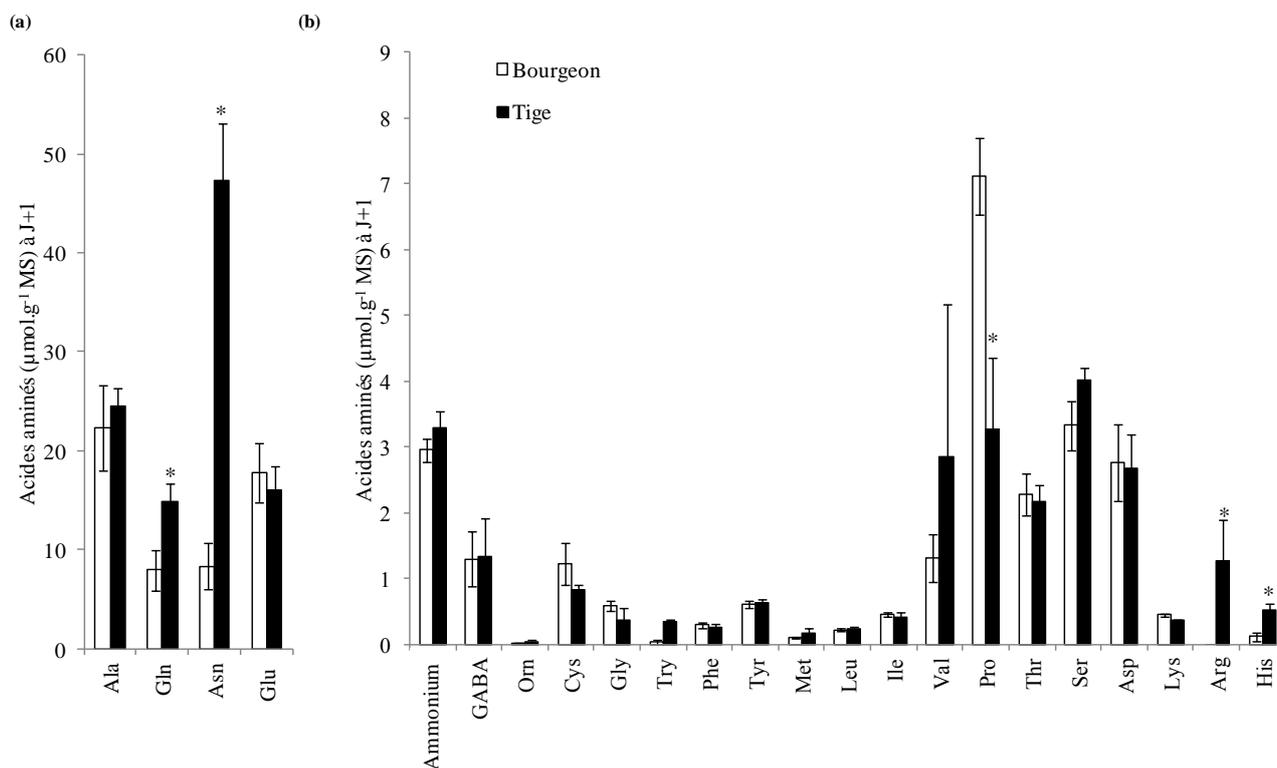
## 2- Étude du transcriptome des bourgeons

### a- Le gène codant l'Asparagine synthétase est stimulé au cours du débourrement

Nous avons comparé, par l'approche RNAseq, les niveaux d'accumulation des transcrits des gènes exprimés dans des nœuds cultivés *in vitro* : (i) sur un milieu MS(-N) contenant 100 mM de saccharose (condition de référence) et (ii) sur ce même milieu supplémenté avec 10 mM de nitrate (condition test). L'analyse des profils d'accumulation des transcrits montre que de nombreux gènes liés au métabolisme des acides aminés sont exprimés en présence de au nitrate (catégorie « Métabolisme primaire », Annexe III). Les voies métaboliques concernées ont été retracées d'après Pratelli & Pilot (2014, Figure 53). Les gènes préférentiellement exprimés dans la condition de référence sont représentés en bleu et ceux surexprimés en réponse au nitrate sont représentés en rouge, tandis que les gènes non affectés sont indiqués en noir. Les gènes codant des enzymes impliquées dans l'assimilation du nitrate et la voie de biosynthèse de l'asparagine sont surexprimés à J+1 en réponse au nitrate dans les tissus qui débourrent, notamment la Glutamine Synthétase (*GS2*), la Glutamate synthase (*GOGAT*) et l'Asparagine synthétase (*ASNS2*).

La validation de ces résultats par q-PCR montre que l'expression du gène codant l'Asparagine synthétase (*ASNS2*) est fortement stimulée en présence de nitrate par rapport à la condition de référence (saccharose seul) à J+1 à l'échelle du nœud (Figure 54a). Ainsi, la différence d'expression observée en RNAseq est validée par les données de q-PCR.

Nous avons comparé l'évolution du transcriptome de tiges (Figure 55a) et de bourgeons (Figure 55b) dont on connaît le devenir en termes d'allongement, après 24 heures (J+1) et 7 jours (J+7) en présence ou en l'absence de saccharose, de nitrate ou d'asparagine. L'expression du gène *ASNS2* est fortement réprimée (80% à 100%) à J+1 dans la tige et les

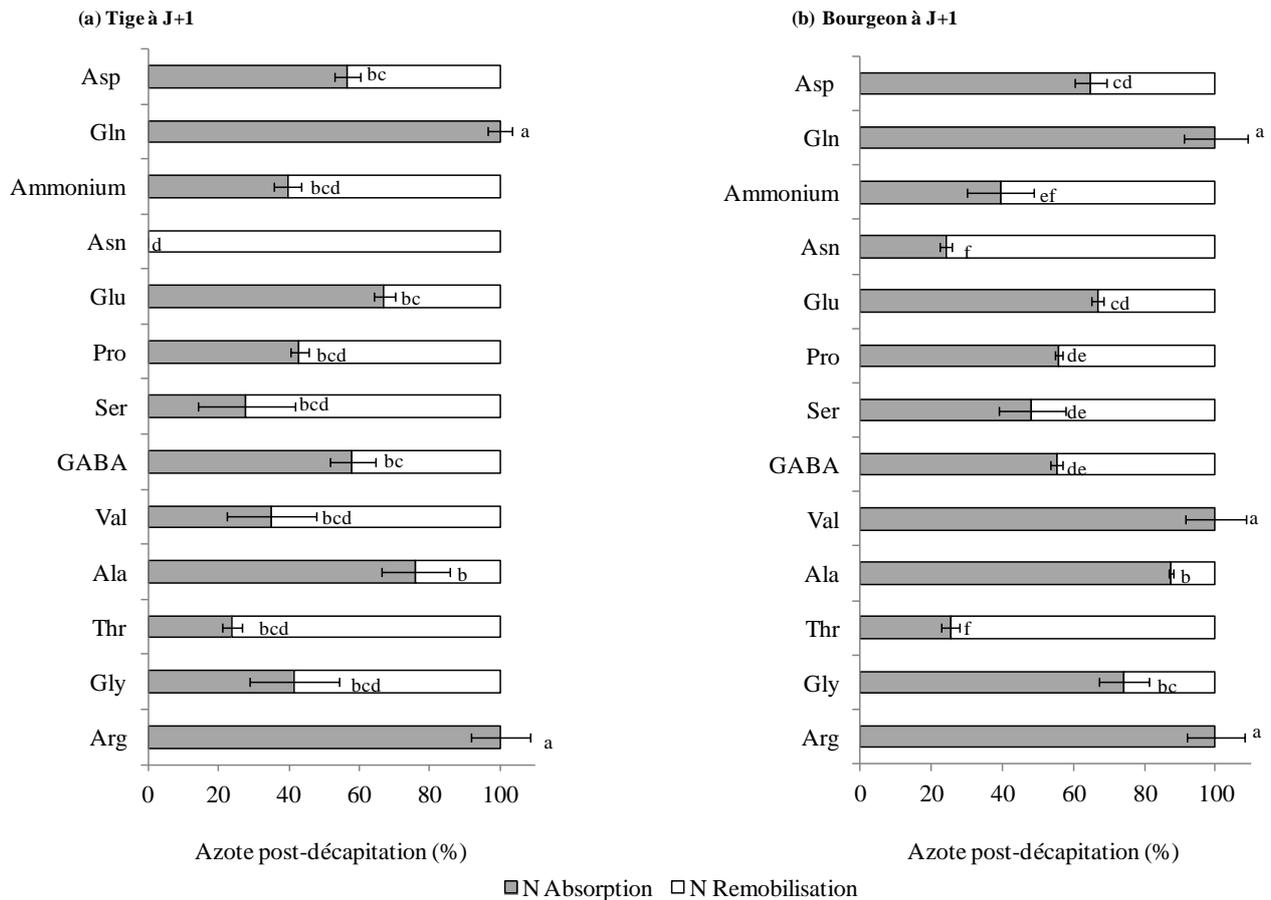


**Figure 56 : teneurs en acides aminés dans la tige et le bourgeon à J+1 *in vitro*.**

**(a)** Acides aminés majoritaires.

**(b)** Ammonium et autres acides aminés.

Les échantillons (tiges et bourgeons, barres noires et blanches, respectivement) sont cultivés en présence de 10 mM de nitrate et de 100 mM de saccharose. Moyennes de trois expériences indépendantes  $\pm$  les erreurs standards (quand elles sont visibles). Les étoiles indiquent les différences significatives entre les deux organes (test de Student,  $p < 0.05$ ).

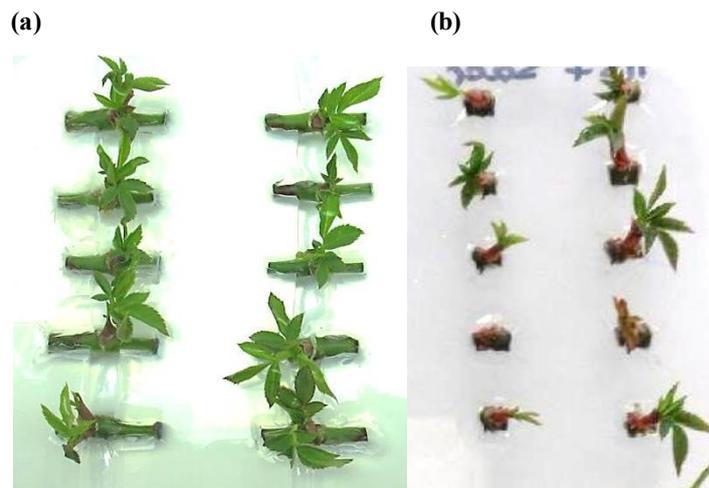


**Figure 57 : origine d'un des atomes d'azote des acides aminés prédominants dans la tige et le bourgeon à J+1 *in vitro*.**

(a) Tige.

(b) Bourgeons.

L'azote des différentes molécules provient des réserves (barres blanches, non marqué) ou de l'assimilation courante (barres grises, marqué). Les échantillons sont cultivés en présence de 10 mM de nitrate et de 100 mM de saccharose. Moyennes de trois expériences indépendantes  $\pm$  les erreurs standards. Les lettres indiquent les différences significatives pour chaque organe (tests de Student et Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).



(c)	Biomasse fraîche (mg) à J+7
Fragment de tige de 1 cm	30,85 ± 1,22
Fragment de tige de 0,3 cm	18,94 ± 2,61 *

**Figure 58 : effet de la taille du fragment de tige sur la biomasse fraîche produite en culture *in vitro* dans les axes II.**

(a) Fragments d'un centimètre.

(b) Fragments de trois millimètres.

(c) Biomasse fraîche produite à J+7.

Moyennes de trois expériences indépendantes ± les erreurs standards. Les étoiles indiquent les différences significatives (tests de Student et Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).

bourgeons en réponse au saccharose associé ou non à une source d'azote, par rapport à la condition de référence (milieu de base à J+1). Ce gène est en revanche légèrement stimulé en réponse à l'asparagine seule (concentration physiologique) dans la tige et le bourgeon à J+1 (1,93 fois et 1,57 fois respectivement), et de manière importante à J+7 (8,94 fois et 7,57 fois respectivement). Le niveau d'accumulation des transcrits du gène *ASNS2* est également important en réponse à la présence simultanée de nitrate et de saccharose dans les axes II à J+7 (8,36 fois par rapport au milieu de base à J+1).

La différence d'expression du gène codant la Glutamine synthétase n'est pas validée par q-PCR et pourrait être un faux positif (Figure 54a). L'expression du gène *GS2* est réprimée à J+1 dans la tige et les bourgeons, quelle que soit la composition du milieu par rapport au milieu de base (Figure 55, Annexe XVII). Cela met davantage en évidence le rôle de l'asparagine dans le débourrement, et questionne celui de la glutamine.

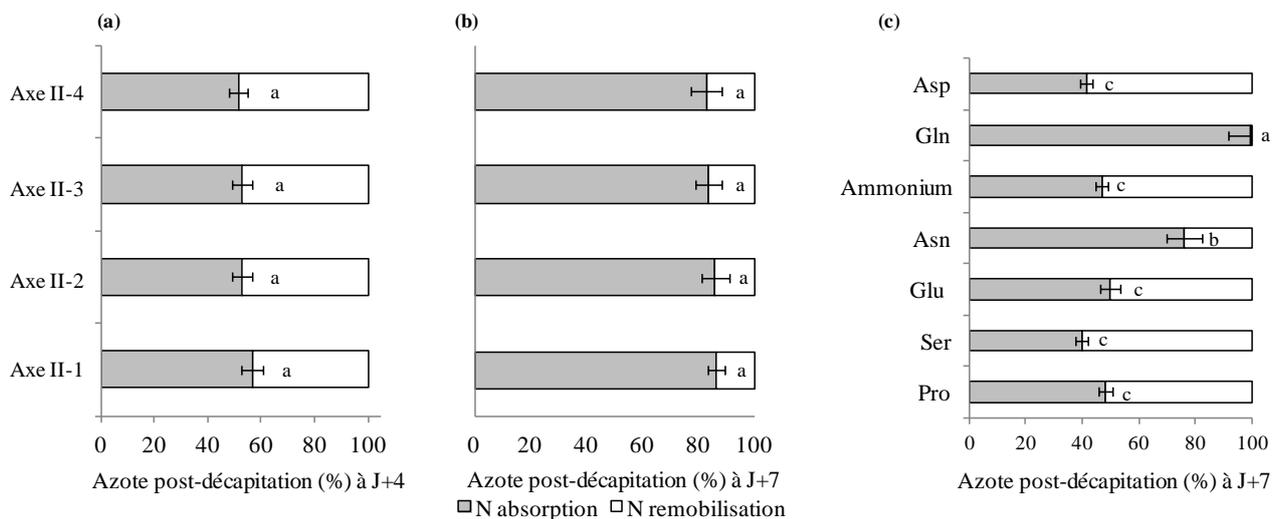
b- Le gène codant l'asparaginase est inhibé au cours du débourrement

L'analyse par q-PCR du niveau d'expression du gène codant l'Asparaginase 2 (*ASNase2*), l'enzyme qui dégrade l'asparagine (Figure 53), montre qu'il est fortement réprimé à J+1 dans les nœuds en réponse au nitrate par rapport à la condition de référence utilisée en RNAseq (saccharose seul, Figure 54a). Le niveau d'accumulation des transcrits du gène *ASNase2* est réprimé à J+1 dans la tige et les bourgeons en réponse au nitrate et à l'asparagine (Figure 55, Annexe XVII). L'asparagine engendre également une baisse de l'expression de ce gène dans la tige lorsqu'elle est associée au saccharose. En revanche, le saccharose seul la stimule fortement à J+1 et J+7. Cela suggère l'implication de cette enzyme dans l'inhibition du débourrement chez le rosier.

## **VI° Origine de l'azote dans les axes II au cours du débourrement**

### **1-Origines de l'asparagine dans les axes II *in vitro***

Nous avons associé le dosage des concentrations en acides aminés à J+1 (Figure 56) à l'utilisation de nitrate marqué au  $^{15}\text{N}$  dans le milieu de culture (Figure 57) pour étudier le métabolisme des acides aminés dans la tige et dans le bourgeon cultivés *in vitro* en présence de saccharose et de nitrate. L'alanine, la glutamine, l'aspartate et l'asparagine sont les acides aminés prédominants à la fois dans la tige et dans le bourgeon ( $10\text{-}50 \mu\text{mol.g}^{-1}$  à J+1, Figure 56a), les autres acides aminés étant faiblement représentés (teneurs inférieures à  $10 \mu\text{mol.g}^{-1}$  à J+1 Figure 56b). La teneur en asparagine est importante dans la tige (près de



**Figure 59 : origine de l'azote dans les axes II et dans les molécules azotées majoritaires.**

(a) Situation à J+4 (d'après les données de la thèse de P.M. Furet, 2010-2013).

(b) Situation à J+7 (d'après les données de la thèse de P.M. Furet, 2010-2013).

(c) Distribution dans les principales molécules azotées.

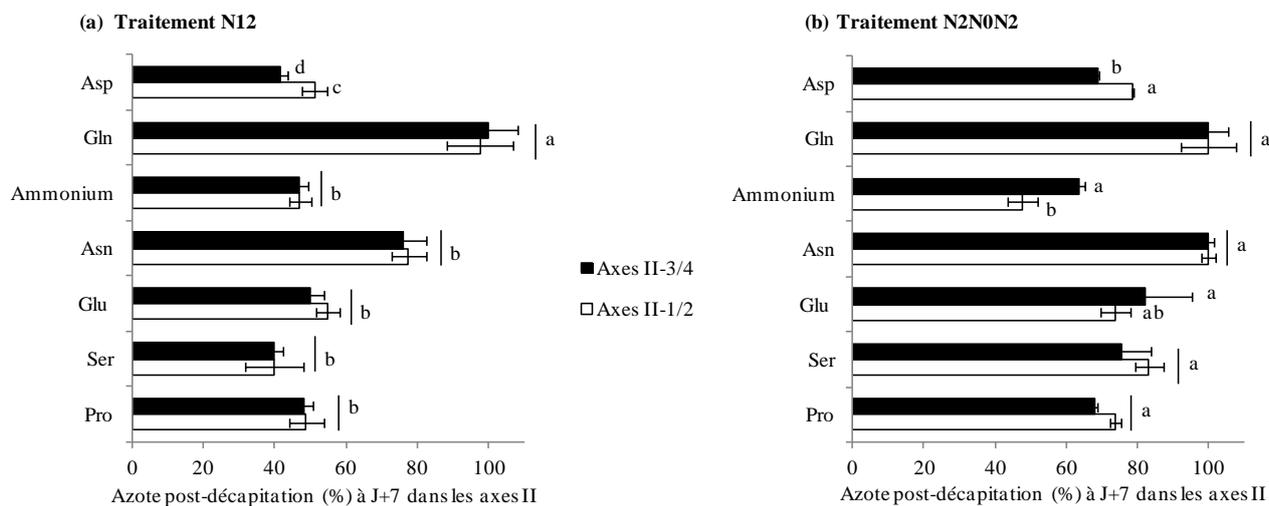
Les échantillons sont prélevés sur plante entière cultivée en présence de 12 mM de nitrate marqué au  $^{15}\text{N}$  ( $\text{K}^{15}\text{NO}_3$ ). L'azote provient des réserves (barres blanches, non marqué) ou de l'assimilation courante (barres grises, marqué). Moyennes de trois expériences indépendantes  $\pm$  les erreurs standards. Les lettres indiquent les différences significatives (tests de Student et Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).

50  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  à J+1, Figure 56a, en noir). Dans le bourgeon en revanche elle est plus faible et comparable aux trois autres acides aminés majoritaires (environ 10  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  à J+1, Figure 56a, en blanc). Les deux atomes d'azote de l'asparagine mesurée dans la tige à J+1 proviennent en totalité de la mobilisation des réserves présentes dans les tissus avant la mise en culture *in vitro* du matériel végétal, alors que 24% des molécules d'asparagine dans les bourgeons ont un atome d'azote issu de l'assimilation courante du nitrate (Figure 57) et 5% ont les deux atomes marqués (donnée non-présentée). En revanche, toutes les molécules de glutamine présentes dans la portion de tige et le bourgeon à J+1 possèdent au moins un atome d'azote issu de l'assimilation courante du nitrate (Figure 57) et 50% d'entre elles ont les deux atomes d'azote marqués au  $^{15}\text{N}$  (donnée non-présentée).

Nous avons cultivé des bourgeons médians sur l'axe I en les maintenant sur des fragments de tige de différentes tailles (5 ou 1 mm de part et d'autre du bourgeon) sur le milieu MS(+N) en présence de 100 mM de saccharose (Figure 58), pour évaluer l'importance de la contribution des réserves internes à la tige dans l'allongement. Les résultats montrent que la biomasse fraîche produite dans les axes II pendant la semaine de culture à la lumière (J+7) est d'autant plus élevée que la portion de tige importante (31 et 19 mg par axe II pour 0,5 et 0,1 cm respectivement).

## 2- Origines de l'asparagine à J+4 et J+7 *in planta*

Nous avons déterminé l'origine de l'azote alimentant les axes II en croissance *in planta*, c'est-à-dire estimé la part de l'absorption courante comparativement à la mobilisation des réserves présentes dans la plante avant la décapitation. Nous avons utilisé pour ce faire du nitrate marqué au  $^{15}\text{N}$  ( $\text{K}^{15}\text{NO}_3$ , 12 mM, Figure 21) ajouté dans la solution nutritive à partir du stade de la décapitation. L'ASR (Allocation Spécifique Relative, « azote post-décapitation », Figure 59a,b) est similaire dans les quatre axes II à J+4 et J+7, indépendamment de la position initiale du bourgeon sur l'axe I. Cela indique que l'origine de l'azote total est similaire pour tous les bourgeons à un instant donné dans le cadre du traitement N12. Cependant, la proportion de l'azote issu de l'absorption courante (azote marqué) augmente au cours de l'allongement des axes II : elle représente 54% à J+4 et 85% à J+7, ce qui signifie que la contribution relative des réserves diminue au fur et à mesure de l'allongement des axes, les réserves étant par définition limitées. Nous avons ensuite déterminé la provenance de l'azote des acides aminés dans les axes II (Figure 59c). À l'issue d'une semaine de marquage (J+7), la glutamine provient en totalité de l'assimilation du nitrate (les deux atomes sont marqués au



**Figure 60 : effet des apports en nitrate sur l'origine d'un des atomes d'azote dans les axes II le long de l'axe I à J+7.**

**(a)** Traitement N12.

**(b)** Traitement N2N0N2.

Les échantillons sont prélevés sur plante entière cultivées en présence de nitrate marqué au  $^{15}\text{N}$  ( $\text{K}^{15}\text{NO}_3$ ). L'origine de l'azote présent dans les deux axes II du sommet et de la base est indiquée respectivement par des barres noires et blanches. Moyennes de trois expériences indépendantes  $\pm$  les erreurs standards (quand elles sont visibles). Les lettres indiquent les différences significatives pour un acide aminé entre les deux traitements (tests de Student et Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).

<sup>15</sup>N). En ce qui concerne l'asparagine, 76% des molécules ont au moins un atome d'azote marqué au <sup>15</sup>N (Figure 59c) et les deux atomes d'azote proviennent de l'absorption courante pour 18,3% d'entre elles (donnée non-présentée). En revanche, l'aspartate, le glutamate, la sérine, la proline et l'ammonium (un seul atome d'azote dans ces molécules) proviennent pour moitié seulement de l'absorption courante (Figure 59c), indépendamment de leur abondance.

### 3- Effets de la disponibilité en nitrate et de la position sur l'axe I sur l'origine de l'azote

Nous avons étudié l'origine des acides aminés alimentant en azote les axes II en croissance en condition de confort (traitement N12, Figure 60a) et sous deux conditions de faible apport de nitrate (traitement N2N0N2, Figure 60b et traitement N6N0N0). La glutamine retrouvée dans les axes II de la base et du sommet provient en totalité (deux atomes marqués au <sup>15</sup>N) de l'assimilation courante du nitrate en réponse au traitement N12. Parmi les molécules d'asparagine, 76% ont au moins un atome d'azote marqué au <sup>15</sup>N et 18,3% d'entre elles sont doublement marquées. Dans le cadre du traitement N2N0N2, 100% des molécules de glutamine et d'asparagine possèdent au moins un atome d'azote issu de l'assimilation courante du nitrate. Cependant, les teneurs mesurées étant faibles, nous n'avons pas d'informations robustes sur le pourcentage de molécules de ces deux acides aminés qui ont leurs deux atomes d'azote marqués au <sup>15</sup>N (ce pourcentage est donc considéré comme proche de zéro). Les axes II sont alimentés en glutamine et en asparagine dans les mêmes proportions entre la base et le sommet de l'axe I pour ces deux traitements malgré les différences phénotypiques. Le glutamate, la proline et la sérine ont la même origine entre les axes II de la base et du sommet, mais la part de l'absorption courante est plus importante lorsque l'apport de nitrate dans la solution nutritive est faible (80% et 60% en moyenne, en réponse aux traitements N2N0N2 et N12, respectivement). L'origine de l'aspartate des axes II de la base provient, pour les traitements N2N0N2 et N12, pour une part importante (79% et 51%, respectivement) du nitrate absorbé après la décapitation de manière plus marquée que dans les axes II du sommet (69% et 42%, respectivement). L'ammonium retrouvé dans les axes II du sommet provient, en réponse au traitement N2N0N2 dans une part nettement plus importante (63,5%) du nitrate absorbé par rapport aux axes II de la base (48%). Cette différence n'est pas présente entre les axes II de la base en réponse au traitement N12.

De plus, les acides aminés retrouvés dans les axes II en croissance (positions II-3 et II-4) en réponse au traitement N6N0N0 sont issus en totalité de la mobilisation des réserves accumulées pendant la croissance des rosiers jusqu'au stade « 3 feuilles développées » (6 mM

**(a) Tige – Référence : *in planta* à J+0**

		Réf: J+0	MS(-N) à J+1
Facteurs de transcription	<i>BRC1</i>	1,00	0,26 *
	<i>TCP11</i>	1,00	0,26 *
	<i>TCP20</i>	1,00	0,86
Cytokinines	<i>IPT3</i>	1,00	0,98
	<i>ARR5</i>	1,00	2,41 *
Auxine	<i>YUC1</i>	1,00	0,71
	<i>PIN1</i>	1,00	0,09 *
Strigolactones	<i>MAX2</i>	1,00	1,97 *
Métabolisme de l'azote	<i>ASNS2</i>	1,00	1,93 *
	<i>ASNase2</i>	1,00	1,75
	<i>GS2</i>	1,00	0,91
Métabolisme des sucres	<i>RhSUC2</i>	1,00	2,26 *
	<i>RhVII</i>	1,00	1,11

Abondance relative des transcrits

**(b) Bourgeon – Référence : *in planta* à J+0**

		Réf: J+0	MS(-N) à J+1
Facteurs de transcription	<i>BRC1</i>	1,00	0,59 *
	<i>TCP11</i>	1,00	0,33 *
	<i>TCP20</i>	1,00	0,63 *
Cytokinines	<i>IPT3</i>	1,00	0,30 *
	<i>ARR5</i>	1,00	3,88 *
Auxine	<i>YUC1</i>	1,00	2,31
	<i>PIN1</i>	1,00	0,43 *
Strigolactones	<i>MAX2</i>	1,00	1,08
Métabolisme de l'azote	<i>ASNS2</i>	1,00	0,43 *
	<i>ASNase2</i>	1,00	6,97 *
	<i>GS2</i>	1,00	1,68 *
Métabolisme des sucres	<i>RhSUC2</i>	1,00	1,48
	<i>RhVII</i>	1,00	1,48 *

Abondance relative des transcrits

**Figure 61 : effet de la mise en culture *in vitro* des nœuds sur l'abondance relative des transcrits des gènes d'intérêt à J+1 en réponse au milieu de base.**

Les résultats sont exprimés en prenant la condition «J+0 *in planta*» comme référence (base 1). Moyennes de trois expériences indépendantes regroupant chacune au moins trois répétitions techniques, soit trois boîtes de Pétri contenant chacune une douzaine de nœuds.

(a) Tige.

(b) Bourgeon.

Moyennes de trois répétitions biologiques. Les étoiles indiquent les différences significatives entre les niveaux d'accumulation des transcrits entre J+0 *in planta* et J+1 *in vitro* sur le milieu de base (test de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ).

de nitrate, Figures 21 et 27), puisqu'ils n'ont reçu aucun apport de nitrate dans la suite de l'expérience.

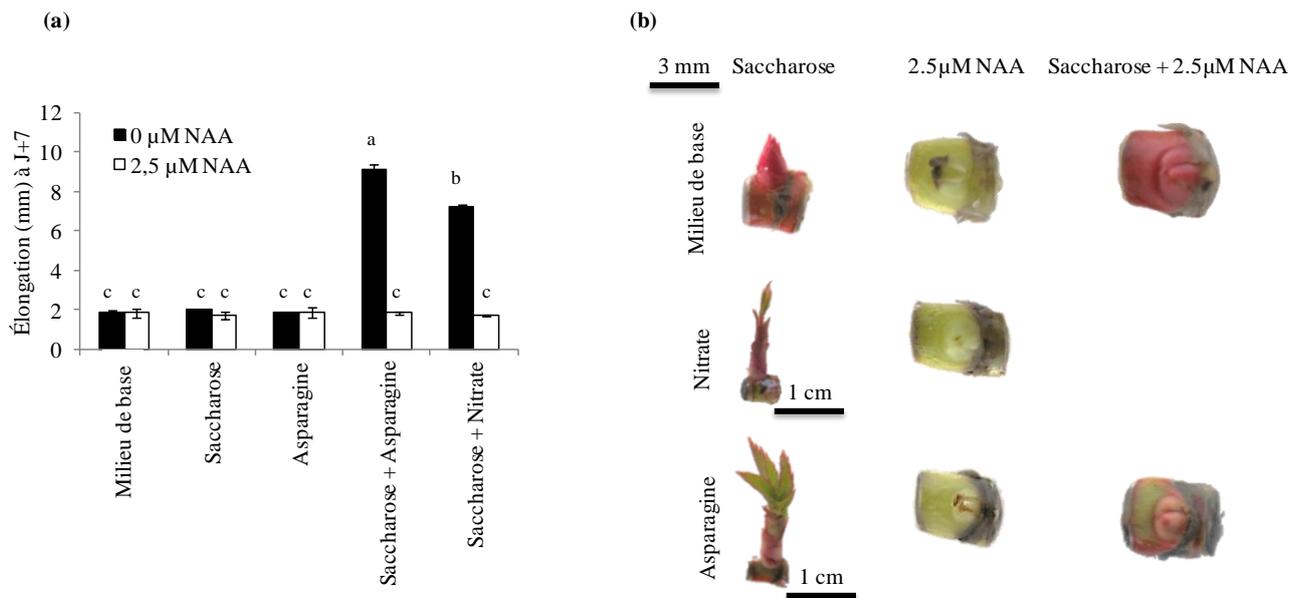
## VII° Effets de l'asparagine sur le statut des régulateurs de croissance au cours du débourrement

### 1- Mise en culture des tissus et levée de dominance apicale

Nous avons comparé l'évolution du niveau d'accumulation de transcrits de plusieurs gènes clés du débourrement (Figure 61) entre J+0 lorsque le bourgeon est dans un état de dormance induit par les inhibitions corrélatives entre les différents organes de la plante (dominance apicale, condition de référence pour ce paragraphe uniquement), et J+1 sur le milieu de base (MS(-N)) où le bourgeon est destiné à rester dormant jusqu'à J+7 par manque d'éléments nutritifs dans le milieu de culture. Bien que la comparaison d'un modèle *in planta* et d'un modèle *in vitro* puisse présenter certaines limites, cela permet de relever des tendances de variation d'accumulation des transcrits de certains gènes en réponse à la mise en culture des tissus et à la baisse soudaine du niveau d'auxine.

Nous avons démontré par q-PCR que le niveau d'accumulation des transcrits du gène *YUC1* impliqué dans la synthèse d'auxine est stimulé dans le bourgeon et réprimé dans la tige entre J+0 et J+1 (Figure 61). Or, la teneur en auxine est réduite de près de 4 fois entre des tissus de tige au voisinage de bourgeons dormants *in planta* et des bourgeons isolés en culture *in vitro* sur le milieu de base à J+1. L'expression du gène *PIN1*, impliqué dans le transport d'auxine, est quant à lui fortement réprimé à la fois dans la tige et les bourgeons. Ces résultats suggèrent une baisse potentielle du transport d'auxine, associée à la probable baisse du niveau d'auxine dans les tissus en réponse à l'excision de la plante entière à J+0.

L'expression du gène *IPT3*, impliqué dans la biosynthèse des cytokinines, ne varie pas dans les tissus de tige entre la situation à J+0 *in planta* et la situation à J+1 *in vitro* sur le milieu de base (Figure 61), alors qu'elle est stimulée par le saccharose, le nitrate ou l'asparagine (Figure 67, Annexe XV). Cela suggère que les molécules apportées dans le milieu de culture contribuent de manière plus importante que la baisse des teneurs en auxine entre J+0 et J+1 (Figure 63c) à la régulation de la production de cytokinines. Cette augmentation du niveau d'accumulation des transcrits s'accompagne de l'augmentation des teneurs des différentes formes de cytokinines dans la tige (entre J+0 et J+1 sur le milieu de base, bases : 6,3 fois, ribosides : 2,0 fois, nucléotides : 1,7 fois, glucosides : 2,1 fois, Figure 67c).



**Figure 62 : effet d'une auxine de synthèse sur l'allongement et le phénotype des bourgeons et jeunes axes II à J+7.**

(a) Allongements des axes II.

(b) Phénotypes des bourgeons et jeunes axes II.

Les échantillons sont cultivés *in vitro* sur milieu de base, additionné de 100 mM de saccharose, de 10 mM d'asparagine ou de nitrate, de 2,5 μM de NAA (1-naphtalene acetic acid). Moyennes de trois expériences indépendantes ± les erreurs standards (quand elles sont visibles). Les lettres indiquent les différences significatives (tests de Student et Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).

L'expression du gène *ARR5*, impliqué dans la signalisation par les cytokinines, est stimulée entre J+0 et J+1 dans la tige et les bourgeons, en réponse à chaque composition du milieu de culture, et davantage pour le milieu de base (Figure 61), suggérant ainsi une régulation de l'accumulation des transcrits de ce gène par la baisse soudaine du niveau d'auxine dans la tige (Figure 63c). C'est pourquoi, lorsque cette dernière condition est prise pour référence (Figure 67a,b), l'expression du gène *ARR5* est réprimée dans la tige et les bourgeons à J+1 et J+7 dans les différents contextes nutritionnels testés, ou ne varie pas en réponse au saccharose à J+1 dans la tige. De plus, deux séquences relatives à un gène impliqué dans la signalisation par les cytokinines (*ARR1*) ont été isolées par l'approche RNAseq à J+1 en réponse au nitrate (ou ses produits d'assimilation) en présence de saccharose (catégorie « Signalisation », Annexe II), mais n'ont pas fait l'objet d'étude plus approfondie par q-PCR.

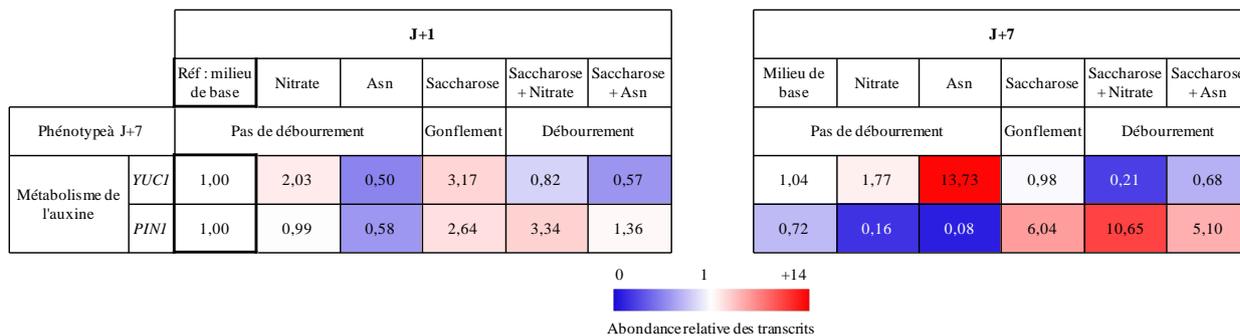
L'accumulation des transcrits du gène *MAX2*, impliqué dans la signalisation par les strigolactones, est stimulée entre la situation à J+0 *in planta* et la situation à J+1 *in vitro* dans la tige sur le milieu de base et en l'absence de saccharose, soit au voisinage de bourgeons destinés à rester dormants jusqu'à J+7 malgré la levée de dominance apicale (Figure 61).

## 2- Liens entre l'asparagine, le saccharose et l'auxine

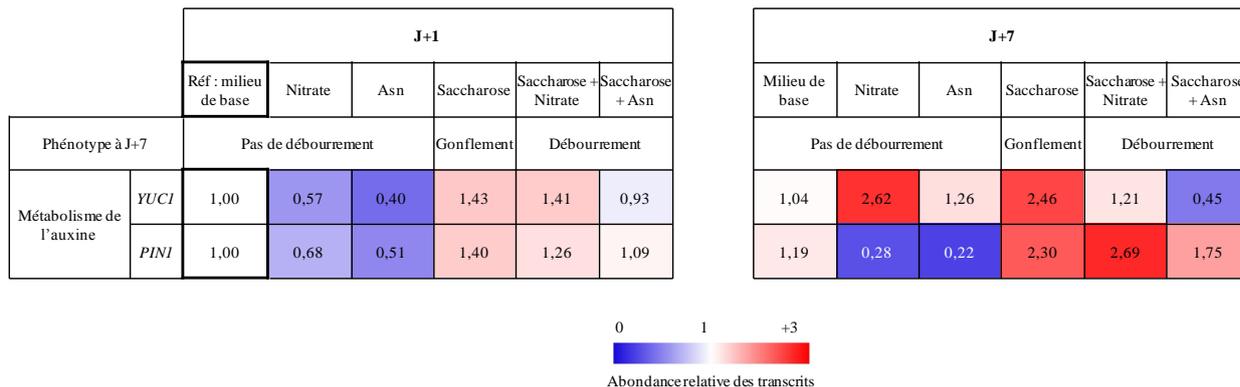
Nous avons cultivé *in vitro* des bourgeons, initialement médians sur l'axe I, en présence d'asparagine (10 mM, Figure 62a), de saccharose (100 mM) et d'auxine à une concentration connue pour inhiber le débourrement *in vivo* chez le rosier (2,5  $\mu$ M, M.D. Perez-Garcia et F. Barbier, données non-publiées). Il s'agit d'étudier l'effet de la présence simultanée d'asparagine et de saccharose sur le débourrement de bourgeons isolés maintenus dormants par la présence d'auxine apportée dans le milieu. Les résultats d'allongement pour les bourgeons cultivés en présence de saccharose et d'asparagine correspondent à ceux présentés en Figure 44b (plus de 8 mm à J+7, Figure 44a). Le débourrement n'a pas été observé en présence d'asparagine, de saccharose et d'auxine après une semaine de culture à la lumière (Figure 62a, phénotypes présentés en Figure 62b).

Nous avons comparé l'évolution du niveau d'accumulation de transcrits des gènes du métabolisme de l'auxine (Figure 63a,b) de tiges et de bourgeons dont on connaît le devenir en termes d'allongement, après 24 heures (J+1) et 7 jours (J+7) en présence ou en l'absence de saccharose, de nitrate ou d'asparagine, par rapport au milieu de base à J+1. L'utilisation de cette référence insiste sur l'effet individuel ou combiné des métabolites apportés dans le milieu sur le statut des gènes impliqués dans le métabolisme des régulateurs de croissance et

(a) Tige – Référence : MS(-N) à J+1



(b) Bourgeon – Référence : MS(-N) à J+1



(c) Tige

	ng.g <sup>-1</sup> MS	Auxine
J+0		58.8 ± 19.5 *
J+1	Milieu de base	15.3 ± 1.6 <b>ab</b>
	Saccharose	18.6 ± 1.4 <b>ab</b>
	Nitrate	20.7 ± 4.9 <b>a</b>
	Asn	11.1 ± 1.8 <b>b</b>
	Saccharose + Nitrate	15.4 ± 1.3 <b>ab</b>
	Saccharose + Asn	11.8 ± 4.1 <b>b</b>

**Figure 63 : métabolisme de l'auxine.**

(a) Accumulation des transcrits de *YUC1* et *PINI* dans la tige et phénotype à J+7 des bourgeons.

(b) Accumulation des transcrits de *YUC1* et *PINI* dans les bourgeons et phénotype à J+7 des bourgeons.

Les échantillons sont cultivés *in vitro* sur milieu de base (pris comme base 1), ou additionné de 10 mM de nitrate, 10 mM d'asparagine, 100 mM de saccharose (seuls ou en combinaison). Les mesures sont effectuées à J+1 et J+7. Moyennes de trois expériences indépendantes.

(c) Teneurs en auxine dans la tige à J+1.

Moyennes de trois expériences indépendantes ± les erreurs standards. Les lettres indiquent les différences significatives entre les différentes compositions du milieu de culture (tests de Student et Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ). Les erreurs-standard sont présentées en Annexe XV.

la nutrition des axes II. L'expression du gène *YUC1*, impliqué dans la biosynthèse de l'auxine, est réprimée dans la tige en réponse à l'asparagine seule ou combinée au saccharose à J+1 par rapport à la condition de référence (milieu de base à J+1). La teneur en auxine dans cet organe est significativement plus basse en réponse à la présence d'asparagine, qu'elle soit associée ou non à du saccharose, par rapport aux autres contextes nutritionnels (Figure 63c). L'expression du gène *PINI*, codant les transporteurs d'auxine, est stimulée fortement à J+7 dans les bourgeons/axes II et la tige lorsque le milieu de culture contient au moins du saccharose.

À l'échelle du nœud cette fois, nous avons retrouvé plusieurs gènes directement liés au métabolisme de l'auxine parmi les séquences isolées par l'approche par RNAseq en réponse au nitrate en présence de saccharose (catégorie « Signalisation », Annexe II) :

- Un des gènes 12 fois surexprimé en réponse à la présence simultanée de nitrate (ou de ses produits d'assimilation) par rapport à la condition de référence (saccharose seul), code l'Amidase 1 (Figure 5a), enzyme capable de convertir l'indole-3-acétamide en auxine (acide indole-3-acétique, Pollmann *et al.*, 2003). Ce gène contribuerait au moins en partie à la synthèse d'auxine dans les bourgeons au cours du débourrement aux côtés du gène *YUC1* (Figures 5a et 63, Annexe XV).

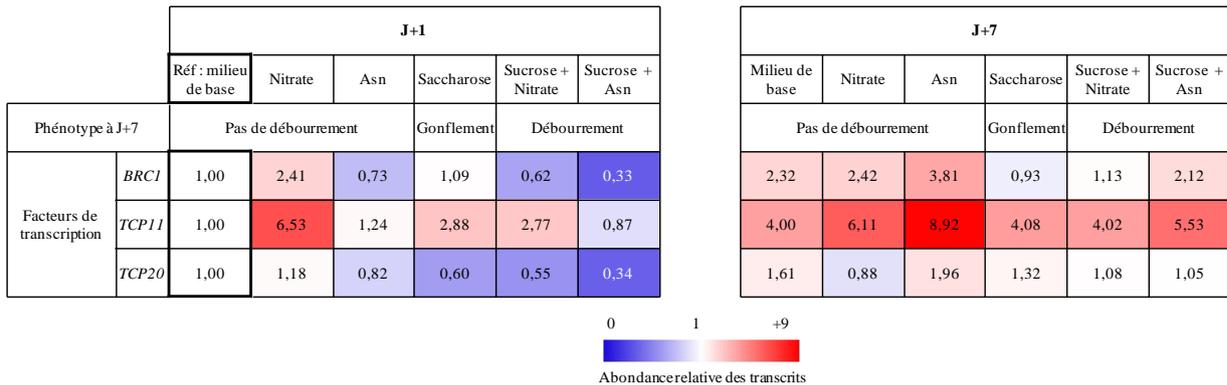
- Le gène *PINI* est 1,7 fois plus exprimé en réponse au nitrate par rapport à la condition de référence où le saccharose est apporté seul. Cependant, les résultats de q-PCR n'ont pas révélé d'effet significatif du nitrate (ou de ses produits d'assimilation, Figure 56 à J+1) en présence de saccharose, sur le niveau d'expression du gène *PINI* à J+1 dans le nœud. Or, le protocole relatif à la q-PCR (Figure 54a) est plus robuste que celui du RNAseq (Figure 54b) où le risque de faux-positif est présent.

## 2- Liens entre l'asparagine, le saccharose et les facteurs de transcription

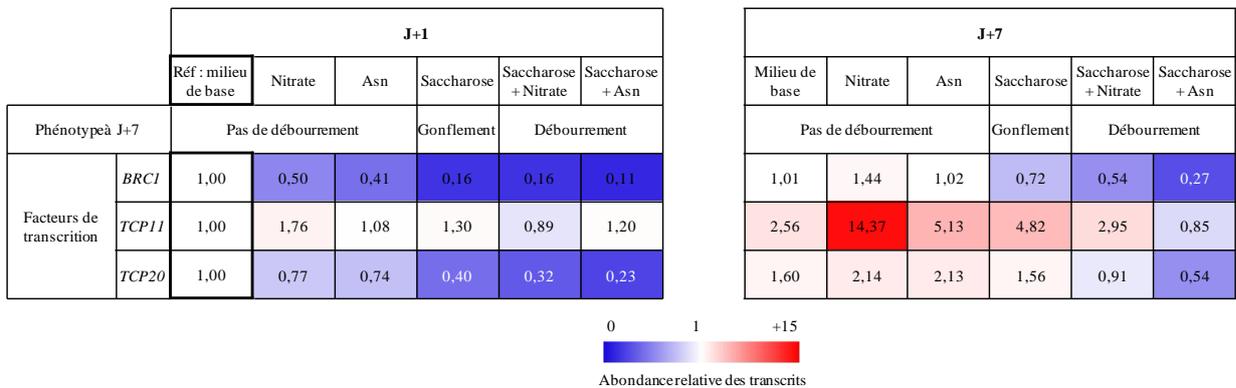
Le gène *BRC1* code un facteur de transcription jouant un rôle central dans l'inhibition du débourrement (Aguilar-Martinez *et al.*, 2007). Le niveau d'accumulation des transcrits de ce gène obtenu par q-PCR est réduit à J+1 à la fois dans le bourgeon et la tige en réponse à la présence d'asparagine combinée ou non au saccharose, ainsi qu'en réponse à la présence simultanée de nitrate et de saccharose (Figure 64, Annexe XVI).

Le gène *TCP11*, codant un facteur de transcription de la même famille que *BRC1*, est également retrouvé en RNAseq 11 fois plus réprimé à J+1 en réponse au nitrate (ou de ses

(a) Tige – Référence : MS(-N) à J+1



(b) Bourgeon – Référence : MS(-N) à J+1



**Figure 64 : accumulation des transcrits des facteurs de transcription.**

(a) Accumulation des transcrits de *BRC1*, *TCP11* et *TCP20* dans la tige et phénotype à J+7 des bourgeons.

(b) Accumulation des transcrits de *BRC1*, *TCP11* et *TCP20* dans les bourgeons et phénotype à J+7 des bourgeons.

(c) Teneurs en auxine dans la tige à J+1.

Les échantillons sont cultivés *in vitro* sur milieu de base (pris comme base 1), ou additionné de 10 mM de nitrate, 10 mM d'asparagine, 100 mM de saccharose (seuls ou en combinaison). Les mesures sont effectuées à J+1 et J+7. Moyennes de trois expériences indépendantes. Les erreurs-standard sont présentées en Annexe XVI.

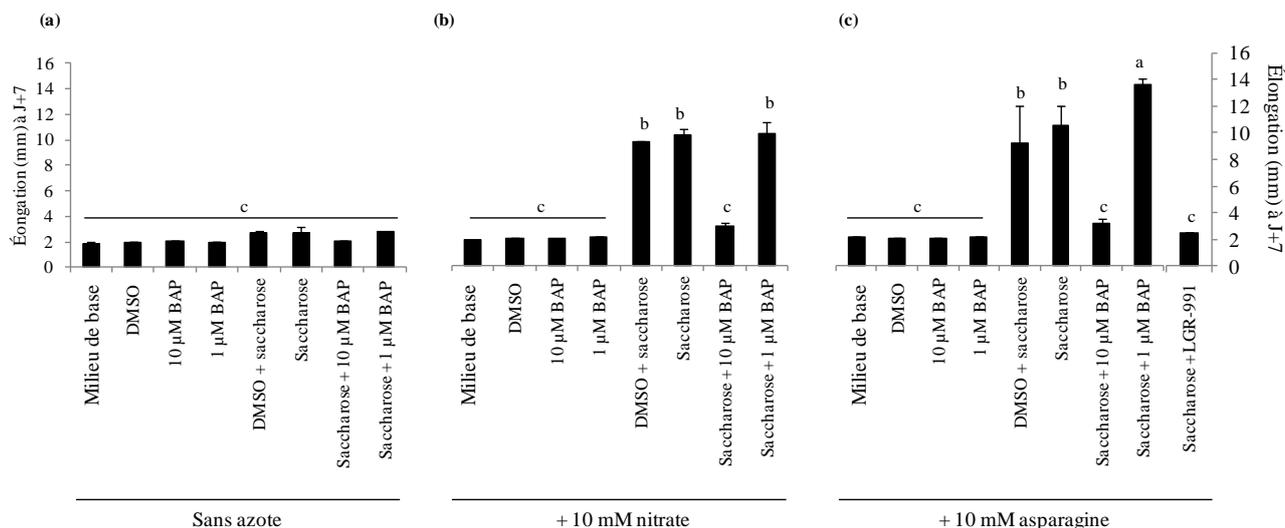
produits d'assimilation, Figure 56) dans le milieu de référence (saccharose seul, catégorie « Signalisation », Annexe II). Ce facteur de transcription possède un domaine de liaison à l'ADN (DNA-binding domain) et se lie préférentiellement sur les séquences GTGGGCCNNN (Viola *et al.*, 2011), régulant ainsi l'expression de gènes cibles. Cependant, les résultats de q-PCR n'ont pas révélé d'effet significatif du nitrate (ou de ses produits d'assimilation, Figure 56) en présence de saccharose, sur le niveau d'expression du gène *TCP11* à J+1 dans le nœud (Figure 64, Annexe XVI). En revanche, ce gène semble légèrement réprimé à J+1 dans la tige et à J+7 dans les axes II en allongement lorsque l'asparagine (concentration physiologique) et le saccharose sont apportés simultanément dans le milieu de culture (Figure 64).

Le gène *TCP11* code un facteur de transcription qui agit de manière coordonnée avec le facteur de transcription codé par le gène *TCP20* (communication personnelle, S. Sakr). Nous avons donc également étudié les effets de molécules d'intérêt sur le niveau d'accumulation des transcrits de ce gène, même s'il n'a pas été retrouvé par l'approche RNAseq. Le gène *TCP20* est réprimé à J+1 dans la tige et le bourgeon, quelle que soit la composition du milieu de culture, mais de manière plus importante en réponse à la présence simultanée d'asparagine et de saccharose (Figure 64). Dans ce contexte nutritionnel, ce gène semble réprimé à J+1 dans la tige et à J+7 dans les bourgeons (axes II en allongement), en association avec le gène codant le facteur de transcription TCP11.

### 3- Liens entre l'asparagine, le saccharose et les cytokinines

Nous avons étudié les liens entre l'asparagine, le saccharose et les cytokinines, régulateurs de croissance connus pour stimuler le débourrement. Nous avons cultivé des bourgeons médians de l'axe I en présence d'asparagine ou de nitrate (10 mM, Figure 65), de saccharose (100 mM) et de cytokinines à deux concentrations (1 et 10  $\mu$ M). Les résultats d'allongement à J+7 en présence du solvant dans lequel la BAP (cytokinine de synthèse) est dissoute (DMSO), ont permis de vérifier l'absence de biais qui seraient dus au protocole. La seule présence des cytokinines dans le milieu de culture basique ne permet pas d'initier l'allongement des axes (environ 2 mm), même en la présence d'azote (nitrate ou asparagine, Figure 65b,c) ou de saccharose (Figure 65a).

En revanche, le débourrement du bourgeon axillaire principal est possible en présence de saccharose et d'azote (nitrate ou asparagine) sans apport de cytokinines dans le milieu de culture (plus de 8 mm à J+7, Figure 65b,c, résultats similaires à ceux présentés



**Figure 65 : effet de l'apport d'azote et de cytokinine de synthèse sur l'allongement des axes II cultivés *in vitro*.**

**(a)** Sans azote.

**(b)** 10 mM de nitrate.

**(c)** 10 mM d'asparagine.

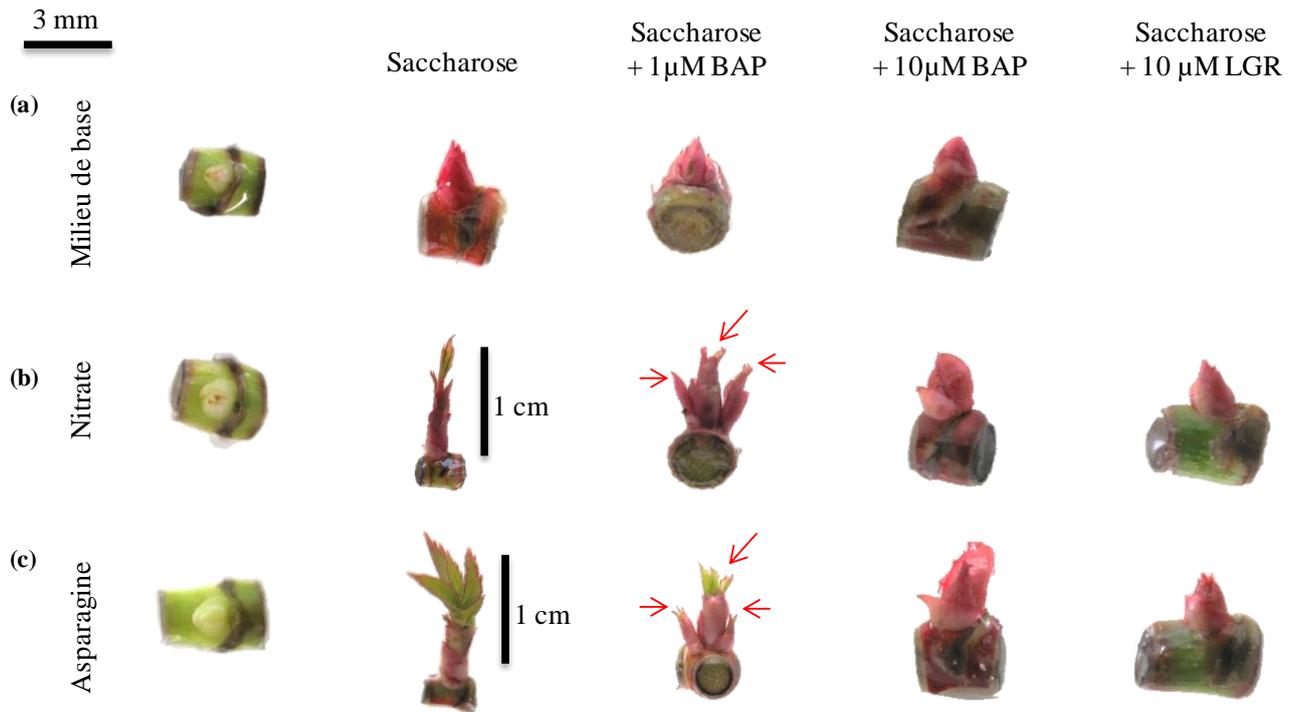
Les échantillons sont cultivés dans les différentes conditions d'apport d'azote en présence/absence de 100 mM de saccharose, de 1 ou 10 µM de BAP (Benzylaminopurine) et de 10 µM de LGR-991 (inhibiteur de perception des cytokinines). Un contrôle correspondant au solvant de la BAP et du LGR-991 (DMSO) a été également réalisé. Moyennes de trois expériences indépendantes ± les erreurs standards (quand elles sont visibles). Les lettres indiquent les différences significatives entre les différentes conditions de milieu (tests de Student et Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).

en Figure 44b). Cependant, il est important de noter que le débourrement des bourgeons ne survient pas en présence d'asparagine et de saccharose lorsqu'un inhibiteur de la perception des cytokinines (LGR-991) est ajouté dans le milieu (2 mm à J+7, Figure 65c, à droite).

Enfin, les trois bourgeons axillaires (le principal et les deux collatéraux) sont tous les trois capables de débourrer lorsque la BAP est apportée à la concentration (1  $\mu$ M) dans le milieu en présence de saccharose et de 10 mM d'azote (nitrate ou asparagine). Leur allongement est conséquent (10 mm et 14 mm respectivement à J+7, Figure 65b,c et 66). L'allongement cumulé des trois axes II ainsi produits est plus important lorsque l'asparagine est associée au saccharose et à la BAP (14 mm), par rapport au milieu dépourvu de BAP (10,9 mm). En revanche, une forte concentration de cytokinines (10  $\mu$ M) inhibe l'allongement des axes II (3 mm, Figure 65b,c). Les phénotypes obtenus à l'issue de la semaine de culture dans les différentes conditions testées sont présentés en Figure 66.

Nous avons ensuite étudié en q-PCR les effets du saccharose (100 mM) et/ou du nitrate ou de l'asparagine (10 mM) sur l'expression des gènes du métabolisme des cytokinines, régulateur de croissance stimulant le débourrement (Figure 67a,b). L'expression du gène *IPT3* est stimulée dans la tige par le nitrate (ou ses produits d'assimilation, Figure 56), l'asparagine (concentration physiologique) et le saccharose. L'expression est plus importante lorsque l'azote est apporté de manière conjointe avec le saccharose (5,2 à 6,5 fois plus entre J+0 et J+1), par rapport au milieu de base. En revanche, l'expression du gène *IPT3* est réprimée à J+1 à dans le bourgeon, quelle que soit la composition du milieu (Figure 67b). Ainsi, les niveaux d'expression du gène *IPT3* pourraient ne pas être régulés de la même manière dans la tige et le bourgeon. Le gène *IPT3* a été retrouvé en RNAseq près de 2 fois plus exprimé dans le nœud en réponse au nitrate (ou de ses produits d'assimilation, Figure 56) par rapport à la condition de référence (saccharose seul, catégorie « Signalisation », Annexe II). Les résultats de q-PCR n'ont pas révélé d'effet significatif du nitrate (ou de ses produits d'assimilation, Figure 56) en présence de saccharose, sur le niveau d'expression du gène *IPT3* à J+1 à l'échelle du nœud. Or, le protocole relatif à la q-PCR (Figure 54a) est plus robuste que celui du RNAseq (Figure 54b) puisque nous n'avons pas pu réaliser de répétitions biologiques (faux-positif).

Les niveaux d'accumulation des transcrits des gènes du métabolisme des cytokinines ont été comparés aux teneurs des différentes formes de cytokinines réellement présentes dans les tissus de tige à J+1 (Figure 67c). Le saccharose provoque une augmentation de la teneur des

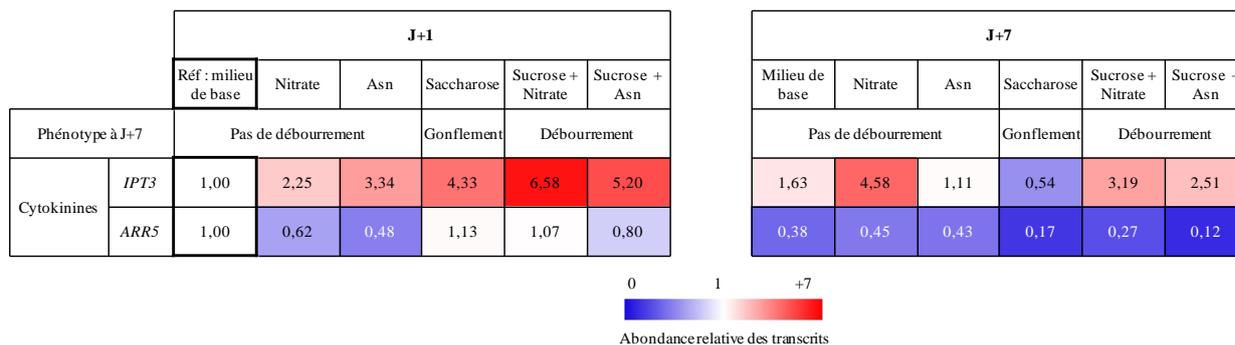


**Figure 66 : phénotype des bourgeons en présence de BAP dans différentes conditions d'apport d'azote.**

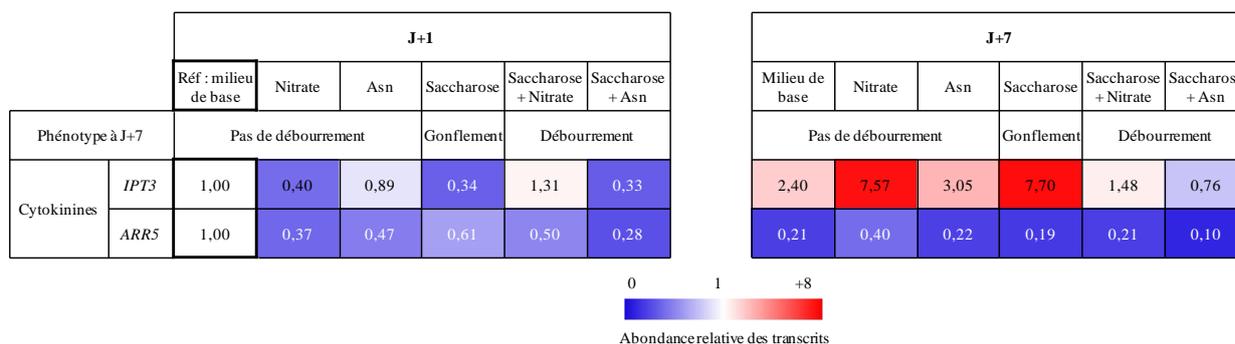
- (a) Sans azote.
- (b) 10 mM de nitrate.
- (c) 10 mM d'asparagine.

Les échantillons sont cultivés sur milieu de base, en présence/absence de 100 mM de saccharose, 1 ou 10  $\mu$ M de BAP, 10  $\mu$ M de LGR-991 (inhibiteur de perception des cytokinines). L'échelle est indiquée par la barre noire.

(a) Tige – Référence : MS(-N) à J+1



(b) Bourgeon – Référence : MS(-N) à J+1



(c) Tige

	ng.g <sup>-1</sup> MS	Formes actives de CK		Formes inactives de CK	
		Bases	Ribosides	Nucléotides	Glucosides
J+0		0.3±0.0 *	15.6±2.8 *	21.5 ± 3.4 *	2.8±0.2 *
J+1	Milieu de base	1.9±0.2 b	31.7±2.8 bc	35.3 ± 0.9 d	6.0±0.3 c
	Saccharose	8.5±0.2 a	58.6±6.6 b	90.3 ± 3.9 c	9.8±0.6 a
	Nitrate	1.0±0.0 b	13.0±2.0 c	31.9 ± 0.9 d	4.2±0.2 d
	Asn	1.9±0.1 b	44.8±6.7 bc	86.7 ± 5.5 c	6.3±0.5 c
	Saccharose + Nitrate	8.2±0.3 a	95.8±19.0 a	144.8 ± 5.7 b	8.2±0.4 b
	Saccharose + Asn	7.6±0.5 a	97.6±17.3 a	170.3 ± 14.2 a	6.3±0.6 c

**Figure 67 : métabolisme des cytokinines.**

(a) Accumulation des transcrits d'*IPT3* et *ARR5* dans la tige et phénotype à J+7 des bourgeons.

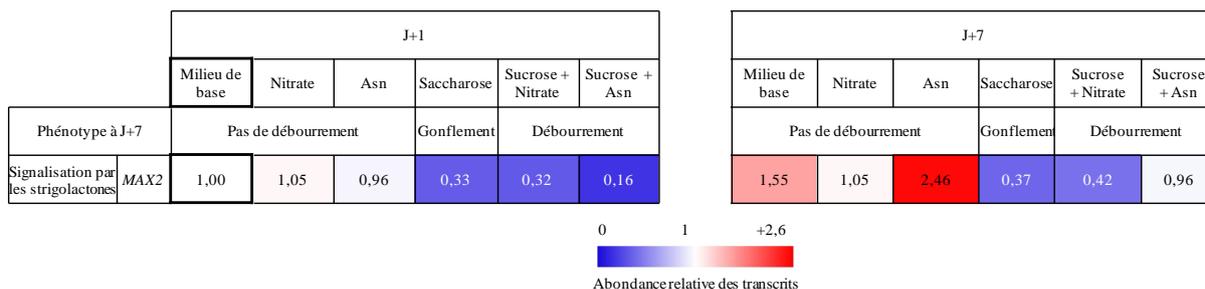
(b) Accumulation des transcrits d'*IPT3* et *ARR5* dans les bourgeons et phénotype à J+7 des bourgeons.

Les échantillons sont cultivés *in vitro* sur milieu de base (pris comme base 1), ou additionné de 10 mM de nitrate, 10 mM d'asparagine, 100 mM de saccharose (seuls ou en combinaison). Les mesures sont effectuées à J+1 et J+7. Moyennes de trois expériences indépendantes.

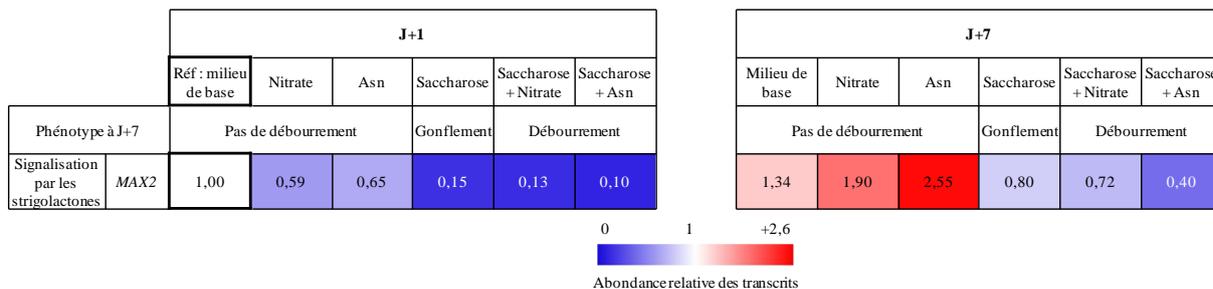
(c) Teneurs des formes inactives et actives de cytokinines dans la tige à J+1.

Moyennes de trois expériences indépendantes ± les erreurs standards. Les lettres indiquent les différences significatives entre les différentes conditions de milieu (tests de Student et Newman-Keuls, p < 0.05). Les erreurs-standard sont présentées en Annexe XV.

(a) Tige – Référence : MS(-N) à J+1



(b) Bourgeon – Référence : MS(-N) à J+1



**Figure 68 : accumulation des transcrits du gène MAX2 dans la tige et le bourgeon.**

(a) Dans la tige.

(b) Dans les bourgeons.

Les échantillons sont cultivés *in vitro* sur milieu de base (pris comme base 1), ou additionné de 10 mM de nitrate, 10 mM d'asparagine, 100 mM de saccharose (seuls ou en combinaison). Les mesures sont effectuées à J+1 et J+7. Moyennes de trois expériences indépendantes. Les erreurs-standard sont présentées en Annexe XV.

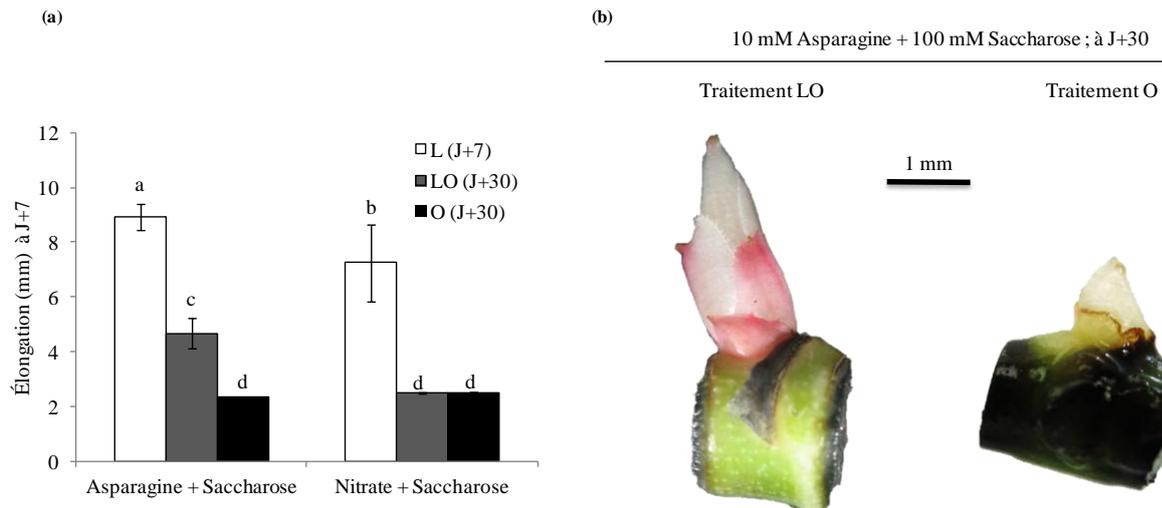
CK bases lorsqu'il est apporté individuellement dans le milieu de culture ou associée à l'une des deux sources d'azote testées (nitrate ou asparagine, 8,1 ng.g<sup>-1</sup> MS en moyenne à J+1). La présence simultanée de saccharose et de nitrate ou d'asparagine engendre une augmentation importante des teneurs en CK ribosides et CK nucléotides dans la tige des tissus cultivés *in vitro* à J+1 (96 et 157 ng.g<sup>-1</sup> MS en moyenne, respectivement à J+1). Les teneurs de CK glucosides, les formes inactives et de dégradation des cytokinines, ne sont pas liées à l'allongement en réponse à la composition du milieu. En revanche, l'augmentation du niveau d'expression du gène *IPT3* à J+1 dans les tissus de tige est associée à l'augmentation de la teneur des formes actives de cytokinines à J+1 et à l'allongement pendant la semaine de culture en présence de saccharose et de nitrate ou d'asparagine.

#### 4- Liens entre l'asparagine, le saccharose et les strigolactones

L'expression du gène *MAX2* est réprimée fortement dans la tige et les bourgeons à J+1 et J+7 en réponse au saccharose seul ou associé au nitrate ou à l'asparagine, par rapport au milieu de base à J+1 (Figure 68, Annexe XV). Aux deux points de cinétique, l'inhibition la plus importante est associée au contexte nutritionnel le plus efficace pour permettre l'allongement des axes II (asparagine à la concentration physiologique et saccharose, Figure 68b). Dans les bourgeons, le nitrate (ou ses produits d'assimilation, Figure 56) et l'asparagine sont capables à eux seuls de provoquer la baisse du niveau d'accumulation des transcrits de ce gène des J+1. Cependant, nous n'avons pas retrouvé de gènes du métabolisme des strigolactones en séquençant sans *a priori* les transcrits dans les nœuds en réponse au nitrate (RNAseq).

### VIII° Liens entre la lumière et l'asparagine

Le besoin absolu de lumière pour le débourrement du bourgeon a été démontré chez le rosier par Girault *et al.* (2008). En revanche, peu d'informations sont disponibles sur les liens entre la lumière et la capacité des axes II à s'allonger dans les premiers stades après l'initiation du débourrement. Nous avons cultivé des bourgeons *in vitro* en présence de 100 mM de saccharose et de 10 mM de nitrate ou d'asparagine (Figure 69). Une partie des boîtes de Pétri a été maintenue à la lumière pendant 7 jours (J+7, traitement « L », photopériode 16 :8 L:D, Figure 69) et une seconde partie à l'obscurité pendant un mois dès la fin de la mise en culture des bourgeons (traitement « O », J+30). Une troisième partie des boîtes de Pétri a été maintenue à la lumière pendant 24 heures (J+1, photopériode 16:8 L:D) puis placées à l'obscurité pendant 29 jours (traitement « LO », J+30). L'allongement des axes II a été mesuré après la semaine de culture pour le traitement L (Figures 44b) et après un



**Figure 69 : effet de la lumière et de la source d'azote sur l'allongement des axes II *in vitro* et le phénotype des bourgeons.**

(a) Allongement des axes II.

(b) Phénotypes des bourgeons.

Les échantillons sont cultivés en présence de 100mM de saccharose et de 10 mM d'asparagine ou de 10 mM de nitrate. Les boîtes de Pétri sont placées en photopériode L:D 16:8 pendant 7 jours (L : barres blanches), pendant un jour à cette photopériode suivi de 29 jours d'obscurité (LO : barres grises) ou à l'obscurité pendant 30 jours (O : barres noires). Moyennes de trois expériences indépendantes  $\pm$  les erreurs standards (quand elles sont visibles). Les lettres indiquent les différences significatives entre les conditions de milieu (tests de Student et Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).

mois pour les traitements LO et O (Figure 69). Aucun allongement n'a été noté en réponse au traitement O, quelle que soit la composition du milieu (2 mm environ à J+30, Figure 69a). En revanche, un axe II court (4,7 mm à J+30) est produit à l'obscurité en présence d'asparagine lorsque le débourrement est initié à la lumière pendant les 24 premières heures de culture (J+1). Cet axe II n'est pas produit dans ces mêmes conditions de traitement si du nitrate est substitué à l'asparagine.

## **IX° Évolution du transcriptome des nœuds au cours du débourrement**

Les analyses ont été menées en utilisant la technique du «RNA sequencing» (RNAseq) déployée au sein du plateau technique ANAN d'Angers (ANalyses des Acides Nucléiques), soutenues par la Structure Fédératrice de Recherche sur la QUASAV (QUALité et la Santé du Végétal). Ce projet comportait trois objectifs :

i) mettre au point d'une «procédure qualité» relative à la technique du RNAseq pour les futurs utilisateurs angevins du plateau technique, dans le cadre du projet TranscriNoeuds (Annexe VIII).

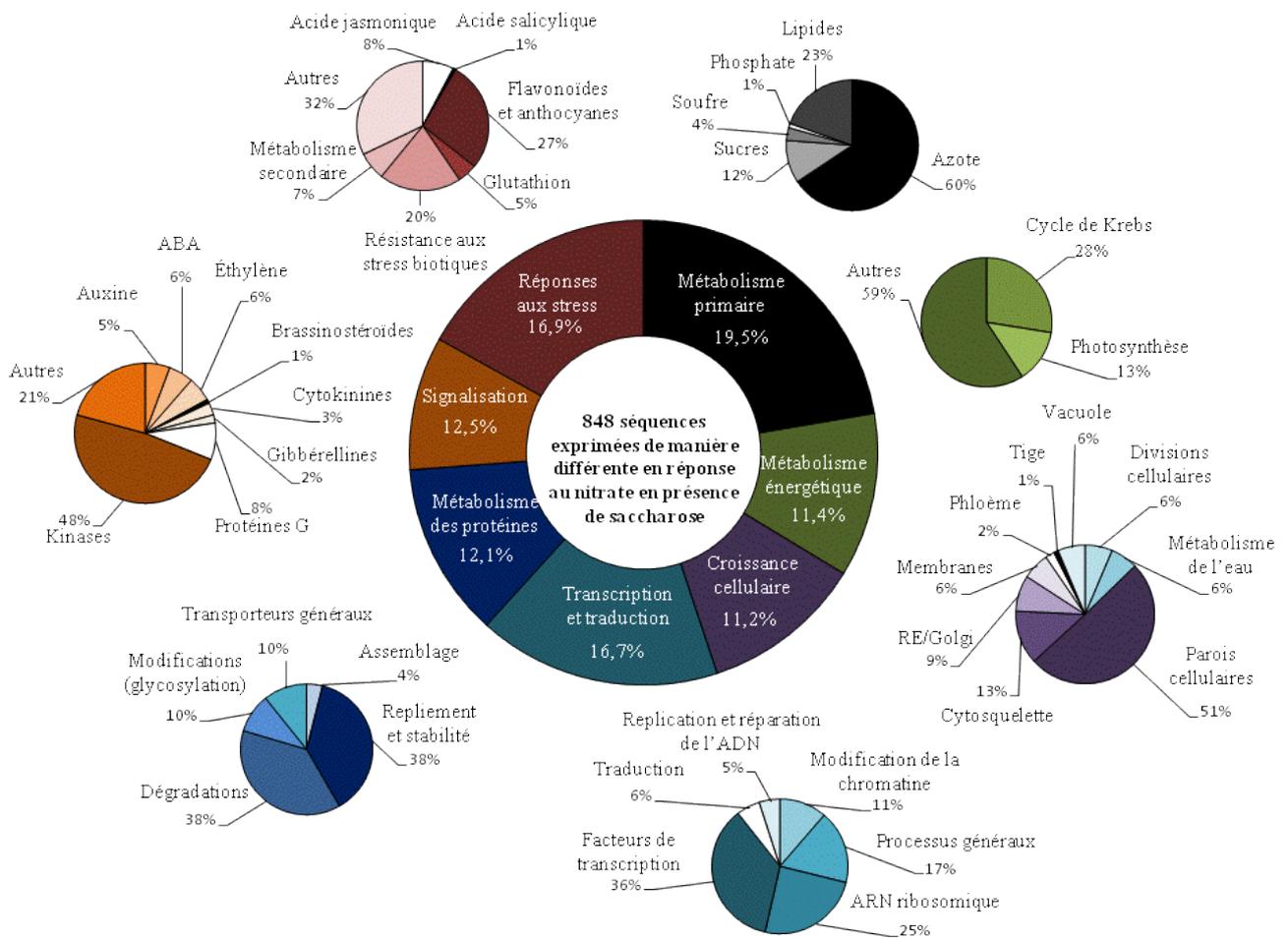
ii) comparer l'effet du multiplexage sur la profondeur d'analyse des résultats obtenus après séquençage.

Ce projet a été mené de la manière suivante :

Le premier séquençage a été réalisé en plaçant seule dans la cartouche la banque d'ADNc (10 pM) de la condition de test (présence simultanée de nitrate et de saccharose, échantillon A) produite à J+1. Nous avons ainsi obtenu une densité de 1626 clusters formés par mm<sup>2</sup> correspondant au séquençage de 32 millions de séquences de 150pb.

Le second séquençage a été réalisé en plaçant simultanément sur la colonne (multiplexage) les banques d'ADNc (8 pM chacune) de l'échantillon A (échantillon A1) et celle de la condition témoin (saccharose seul, échantillon B). Nous avons obtenu une densité de 400 clusters formés par mm<sup>2</sup> au cours de ce séquençage correspondant à 10 millions de séquences de 150 pb pour chaque échantillon (20 millions au total).

Ainsi, la profondeur des résultats obtenus se trouve en adéquation avec la quantité d'ADNc initialement déposée dans la cartouche, et avec le nombre d'échantillons à déposer. Nous avons retrouvé une plus grande diversité d'expression entre l'échantillon A et

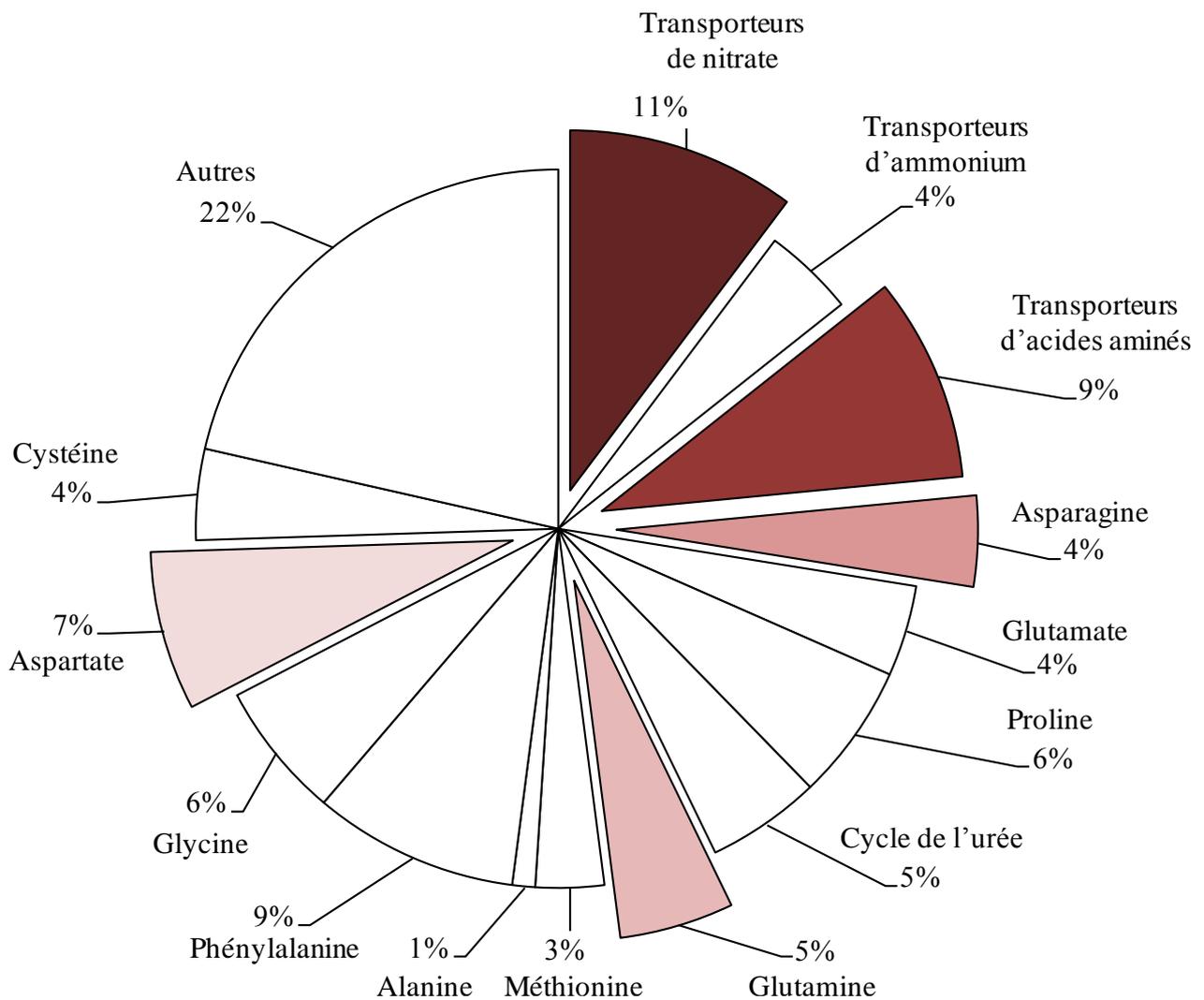


**Figure 70 : typologie des séquences exprimées ou réprimées à J+1 en réponse au nitrate dans les nœuds cultivés *in vitro*.**

Les échantillons sont cultivés sur milieu de référence contenant 100 mM de saccharose et sur milieu de test additionné de 10mM de nitrate. La répartition des 848 séquences isolées en différentes catégories est réalisée d'après Beuvan *et al.* (2009). Les différentes catégories sont identifiées par un différentes nuances de couleur (gris pour le métabolisme primaire, vert pour le métabolisme énergétique, violet pour la croissance cellulaire, bleu pour les phénomènes généraux liés à la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle et le métabolisme des protéines, orange pour les phénomènes de signalisation et rouge pour les réponses aux stress biotiques et abiotiques).

l'échantillon A1, qu'entre l'échantillon A1 et B. Nous avons choisi de ne considérer que les données issues du multiplexage car le séquençage des deux échantillons a été réalisé dans les mêmes conditions. Nous avons considéré la liste des gènes qui présentent statistiquement le maximum de différence d'expression entre la condition de référence (saccharose seul) et celle comportant en plus du nitrate. **Au vu de l'absence de répétitions biologiques, nous avons exprimé ces variations comme un ensemble de données qualitatives plus que quantitatives.** Cette posture nécessite donc de nombreuses validations ultérieures par q-PCR afin de valider les différences d'expression des gènes ainsi identifiés. Les séquences obtenues ont d'abord été alignées sur le transcriptome du fraisier (Vukosavljev *et al.*, 2016), Rosacée proche du rosier. Le faible pourcentage d'alignement des séquences sur cette référence (30%), nous a conduit à réaliser un auto-assemblage des séquences issues du séquençage des échantillons A, A1 et B (S. Pelletier, S. Aubourg et S. Gaillard, équipe BioInfo de l'IRHS). Cette stratégie a permis d'aligner 80% des séquences. Les 20% de séquences restantes correspondent à des séquences de trop mauvaise qualité ou issues d'éventuelles contaminations. Cette proportion de séquences écartées lors de l'assemblage est fréquemment rencontrée en RNAseq (données personnelles, S. Peltier). **Le transcriptome de référence de *Rosa hybrida* est destiné à devenir un outil important pour les membres de l'équipe Arch-E, notamment pour définir des amorces sans dorénavant utiliser le transcriptome du fraisier et/ou de *Rosa wischurana* (équipe GDO de l'IRHS).**

iii) Le troisième objectif du projet TranscriNoeuds était d'identifier de la manière la plus exhaustive possible (approche sans *a priori*) les verrous qui limitent le débourrement des bourgeons cultivés *in vitro*. Nous avons cultivé des bourgeons sur un fragment de tige de taille réduite (1 mm de part et d'autre du bourgeon) sur milieu de référence (contenant du saccharose) et sur le milieu de référence supplémenté avec du nitrate. Nous avons déterminé les variations de l'expression survenant chez *Rosa hybrida* en réponse à la présence de nitrate, après un jour de culture *in vitro* à la lumière. Les échantillons ont été récoltés à un temps précoce en termes d'allongement (J+1) afin de déterminer s'il est possible d'utiliser l'état du transcriptome afin de prédire le développement l'axe II à J+7. Nous avons décidé de mener notre étude en considérant comme un seul échantillon l'ensemble formé par le fragment de tige et le bourgeon axillaire. Nous avons identifié, au terme de ce processus, un total de 848 séquences qui sont exprimées de manière contrastée entre la condition témoin (sans nitrate) et la condition test (avec nitrate) en présence de saccharose dans les nœuds. Ces gènes ont été répartis en grandes catégories physiologiques (Figure 70), d'après Beuvan *et al.*



**Figure 71 : part relative des différents aspects du métabolisme primaire de l'azote identifiés par l'approche RNAseq.**

Les échantillons sont cultivés sur milieu de référence contenant 100 mM de saccharose et sur milieu de test additionné de 10mM de nitrate. Les catégories mises en évidence sont celles plus particulièrement abordées dans la discussion.

(2009). Parmi ces 848 séquences, 12,5% correspondent aux signaux échangés dans les nœuds, 19,5% et 12,1% des séquences ont été respectivement associées au métabolisme primaire (notamment lié à l'azote, Figure 71) et au métabolisme des protéines. Environ 11,2% des séquences sont impliquées dans la structure et la croissance cellulaire. Le métabolisme du stress représente quant à lui 16,9% du nombre total de séquences analysées et pourrait être lié à divers aspects de la culture des échantillons végétaux (blessure, carence en azote, lumière, température dans les boîtes de Pétri, contaminations éventuelles non-visibles à J+1 au moment de la récolte, *etc.*). Enfin, toutes ces modifications potentielles d'expression du génome sont accompagnées de variations importantes des gènes relatifs au métabolisme énergétique et de la machinerie de transcription et de traduction des gènes (11,4% et 16,7% respectivement).

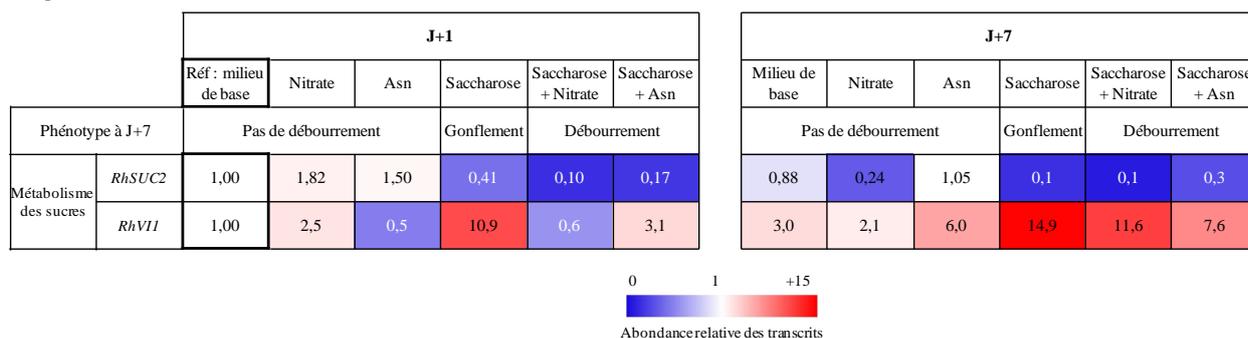
1- Catégories de gènes dont la pertinence a été étudiée par des expériences ou corrélée à d'autres résultats

a- Métabolisme de l'azote

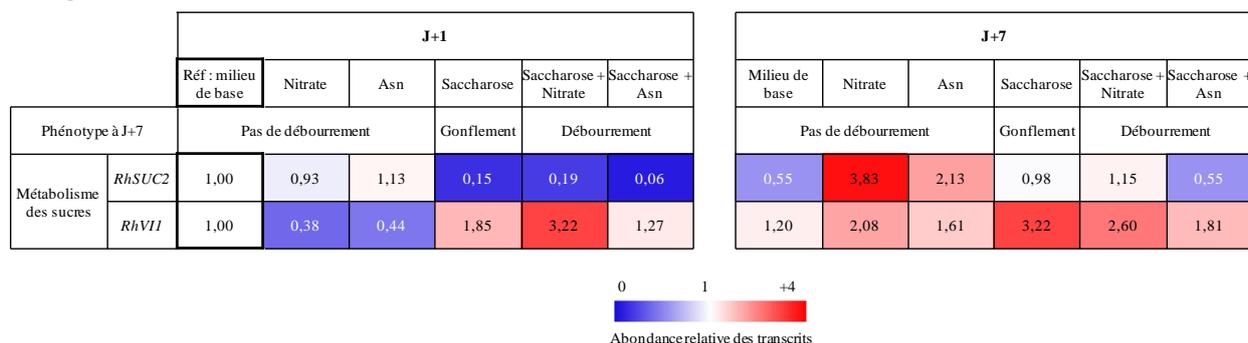
**Transport de nitrate.** Il existe deux types de transporteurs de nitrate. i) Les gènes de la famille de NRT2 codent des transporteurs qui ont une forte affinité pour le nitrate mais une faible capacité d'absorption (HATs). Dans nos conditions, ces gènes sont réprimés à J+1 dans les nœuds en présence de nitrate (catégorie « Métabolisme primaire », Annexe III). Ce faible niveau de transport de nitrate est associé à l'absence de nitrate dans le milieu de culture et à l'incapacité des bourgeons à débousser en sept jours de culture à lumière. ii) À l'inverse, les gènes de la famille de NRT1/NPF, codant des transporteurs qui ont une faible affinité pour le nitrate mais une forte capacité d'absorption (LATs), sont surexprimés en réponse au nitrate. Ce fort niveau potentiel de transport du nitrate dans les tissus est associé à la forte concentration de nitrate dans le milieu de culture et à l'incorporation d'azote dans les acides aminés dans les tissus dès J+1 (Figures 56 et 57).

**Transport des acides aminés.** Plusieurs gènes codant des transporteurs d'acides aminés sont activés au cours du débousserment et représentent 9% des séquences de la catégorie « Métabolisme primaire de l'azote » (Figure 71, Annexe III). Nous proposons de retenir notamment le gène codant la Perméase 3 (AAP3), qui est surexprimé 2,2 fois à J+1 en réponse au nitrate par rapport à la condition de référence. Cette protéine permet le transport du GABA, de proline et d'ammonium (Breitkreuz *et al.*, 1999). La synthèse potentielle d'un

(a) Tige – Référence : MS(-N) à J+1



(b) Bourgeon – Référence : MS(-N) à J+1



**Figure 72 : accumulation des transcrits des gènes *RhSUC2* et *RhVII* (métabolisme des sucres) dans la tige et le bourgeon.**

(a) Dans la tige.

(b) Dans les bourgeons.

Les échantillons sont cultivés *in vitro* sur milieu de base (pris comme base 1), ou additionné de 10 mM de nitrate, 10 mM d'asparagine, 100 mM de saccharose (seuls ou en combinaison). Les mesures sont effectuées à J+1 et J+7. Moyennes de trois expériences indépendantes. Les erreurs-standard sont présentées en Annexe V XIII.

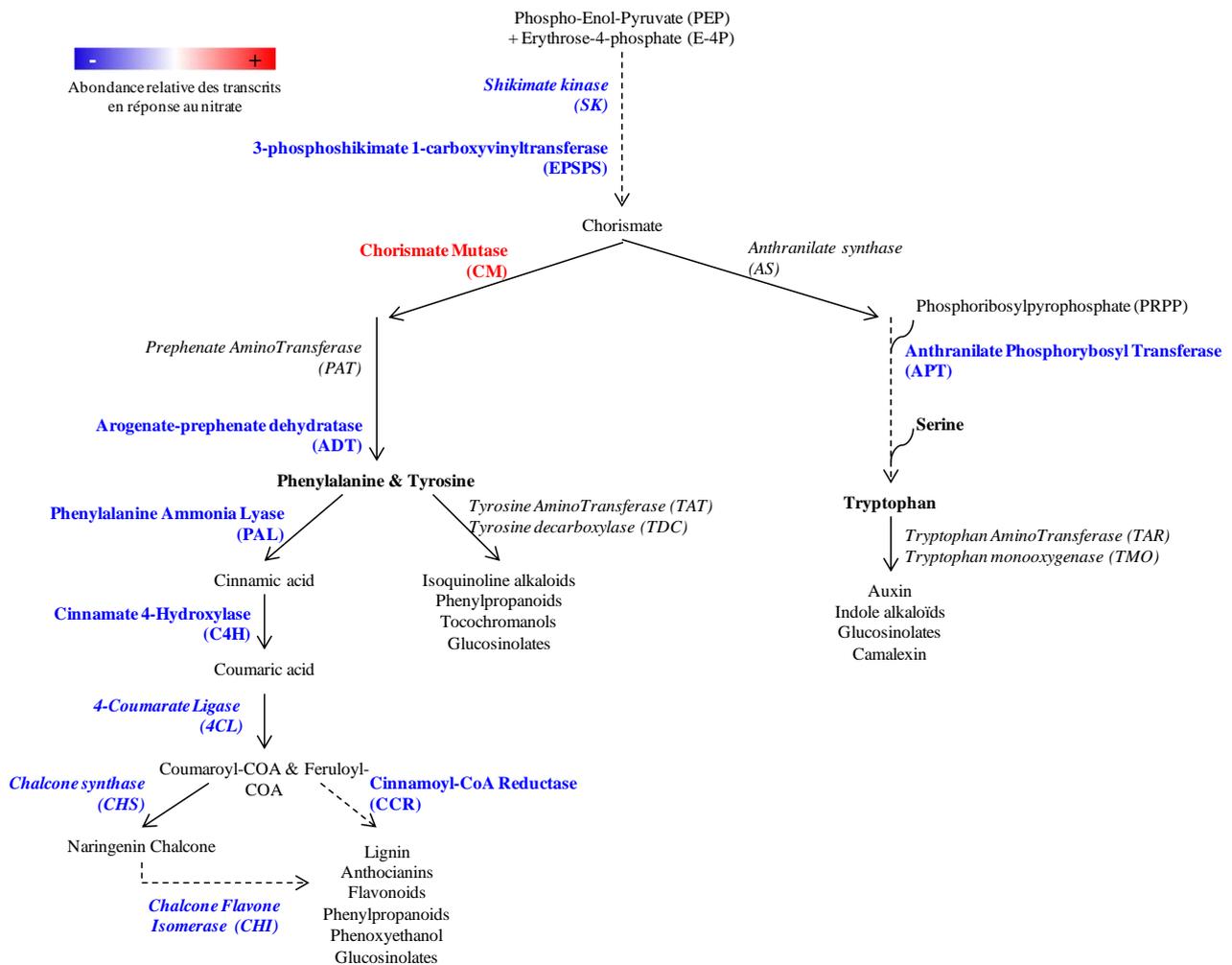
transporteur de GABA peut être rapprochée d'autres résultats. Dans nos conditions, nous avons démontré que le débourrement *in vitro* est possible en présence de GABA, à une concentration non-physiologique. De plus, les concentrations en GABA augmentent dans la sève au cours du débourrement, de manière conséquente chez les plantes sous traitement N6N0N0 (Figure 34).

#### b- Métabolisme des sucres

**L'expression du gène *RhSUC2*.** Nous n'avons pas retrouvé de séquences relatives au gène *RhSUC2* codant un transporteur de saccharose, parmi les gènes caractérisés par RNAseq. Ce gène est connu pour être stimulé au cours du débourrement chez *Rosa hybrida* (Henry *et al.*, 2011). C'est pourquoi, nous avons tout de même étudié par q-PCR la variation du niveau d'accumulation des transcrits de ce gène en réponse au nitrate (Figure 72, Annexe VXIII) ou à l'asparagine et au saccharose au cours du débourrement. Son expression est légèrement stimulée dans la tige en présence de nitrate ou d'asparagine (1,8 fois et 1,5 fois respectivement, Figure 54), par rapport au milieu de base à J+1. Cependant gène est de manière surprenante fortement réprimé à la fois dans la tige et les bourgeons en présence de saccharose seul ou associé à une source d'azote, notamment l'asparagine.

**L'expression du gène *ERD6-16*.** Le gène codant le transporteur ERD6-16 voit son expression stimulée 2,7 fois à J+1 en réponse au nitrate par rapport à la condition de référence (saccharose, catégorie « Métabolisme primaire des sucres », Annexe III). Les Transporteurs de MonoSaccharides (MST) assurent le transit de divers sucres et molécules (hexoses, polyols, inositol, pentoses et tétroses) au travers des membranes cellulaires (Büttner, 2007). La famille des MST(-like) comprend sept sous-familles chez l'arabette (Johnson *et al.*, 2006; Büttner, 2007), dont celle des transporteurs ERD6-like (Early-Responsive to Dehydration-like) qui sont induits par la déshydratation et les basses températures (Kiyosue *et al.*, 1998), et faciliterait le transport du glucose (Büttner, 2007). Cependant, l'expression de ce gène a été récemment associée à l'un des quatre réseaux de gènes régulateurs du débourrement (GSN pour « Gene Regulatory Network ») identifiés dans les bourgeons en réponse à une carence en carbone limitant ce phénomène chez l'arabette, la vigne et le peuplier (Tarancón *et al.*, 2017).

**L'expression du gène *SWEET 9*.** Le gène codant le transporteur bidirectionnel SWEET 9 est 2,9 fois plus exprimé en réponse au nitrate, par rapport à la condition de référence (catégorie « Métabolisme primaire des sucres », Annexe III). Les transporteurs de sucres de



**Figure 73 : variation d'expression des acteurs de la voie de biosynthèse des composés phénoliques identifiés par l'approche RNAseq.**

Les variations d'expression des gènes de ces voies induites par l'apport de nitrate en présence de saccharose sont indiquées en rouge (sur-expression) ou en bleu (sous-expression). Schéma modifié d'après Pratelli *et al.* (2014).

type SWEET permettent l'efflux de sucres au travers des membranes (Chen *et al.*, 2010). Le gène *SWEET9* est connu pour coder un transporteur de saccharose impliqué dans la production de nectar chez l'arabette, chez *Nicotiana attenuata* et chez *Brassica rapa* (Lin *et al.*, 2014). À notre connaissance, aucune étude n'a associé l'expression de ce gène au débourement.

**L'expression du gène codant une Tréhalose Phosphatase.** Le tréhalose est un sucre composé de deux molécules de glucose. Des séquences relatives au gène codant une Tréhalose Phosphatase (TPP), enzyme responsable de la production de tréhalose libre à partir de tréhalose phosphate, est 2 fois moins exprimé en présence de nitrate par rapport au milieu de référence. Le tréhalose et le tréhalose-6-phosphate exercent un rôle dans la signalisation glucidique au travers du contrôle du complexe SnRK1 (Zhang *et al.*, 2009) et sont impliqués dans l'architecture chez l'arabette (Chary *et al.*, 2007), mais ces aspects n'ont pas été approfondis dans le cadre de ces travaux.

### c- La synthèse d'anthocyanes

Plusieurs gènes codant des enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse des flavonoïdes, dont les anthocyanes, sont réprimés en présence de nitrate par rapport à la condition de référence (catégorie « Réponses aux stress », Annexe VII, Figure 73). Nous proposons de retenir notamment les gènes codant la Shikimate kinase (SK), la 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransférase (EPSPS), la Chorismate Mutase (CM), l'Arogonate-préphénate déhydratase (ADT), la Phénylalanine Ammonia Lyase (PAL), la Cinnamate 4-Hydroxylase (C4H), la 4-Coumarate Ligase (4CL), la Cinnamoyl-CoA Réductase (CCR), la Chalcone synthase (CHS) et la Chalcone Flavone Isomérase (CHI). Ces résultats suggèrent que les nœuds cultivés dans la condition de référence produisent plus de pigments flavonoïdiques qui sont probablement responsables de la teinte rouge que prennent les tissus de bourgeons dès J+1 (Figure 45). Les pigments, notamment les anthocyanes, représentent une source importante d'antioxydants et peuvent constituer une forme de stockage de carbone pour les plantes. L'étude par q-PCR (Figure 54a) des variations de l'expression du gène codant l'Anthocyanine synthase (*LDOX*) en réponse au nitrate montre qu'il est inhibé de 60% en présence de nitrate, en adéquation avec les résultats de RNAseq (Figure 54b).



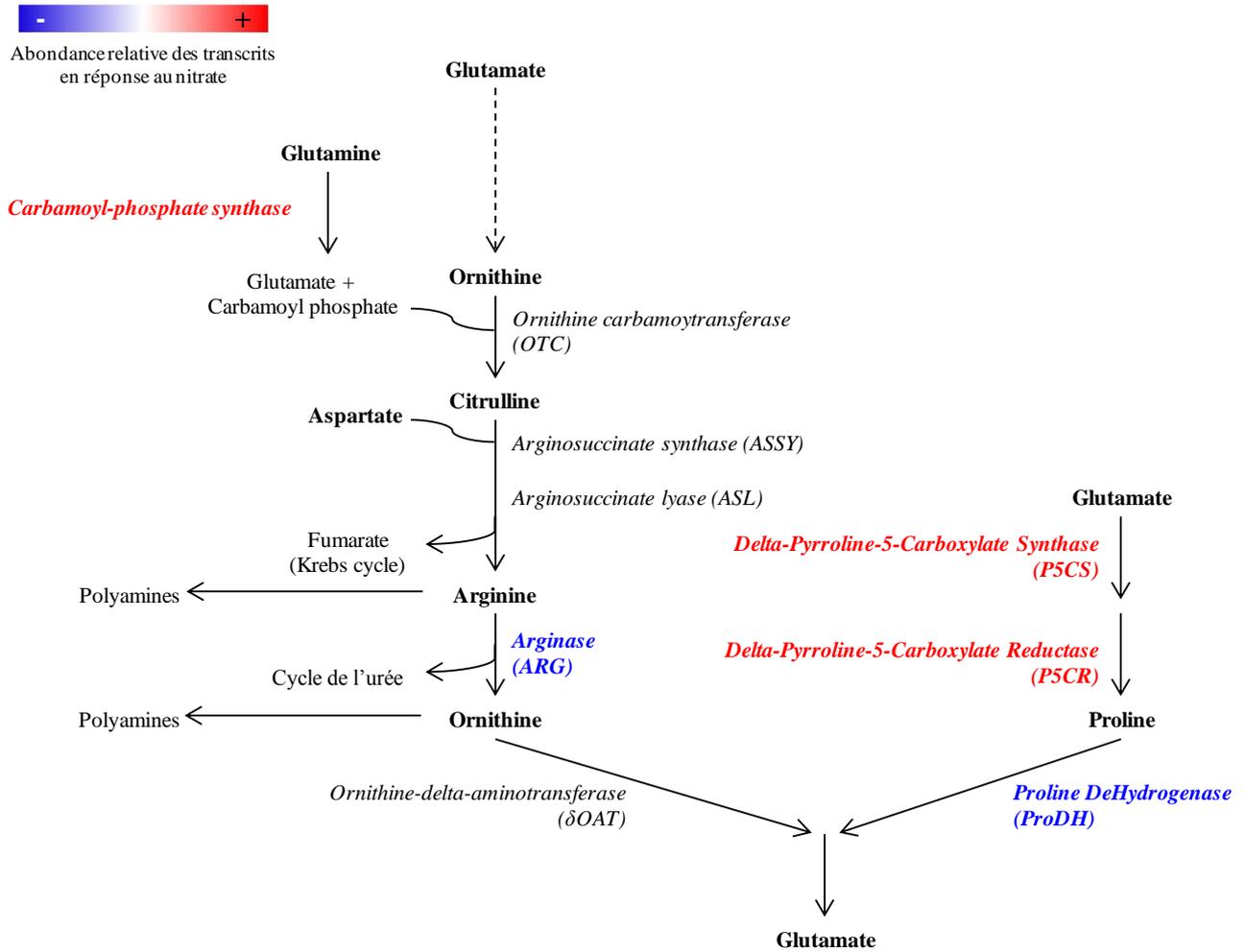
#### d- Le métabolisme de l'eau

Plusieurs gènes codant des aquaporines (*PIP2-1*, *PIP2-5*, *SIP1-1* et *NIP6-1*) ont été retrouvés parmi les gènes sélectionnés statistiquement par l'approche RNAseq (catégorie « Métabolisme de l'eau », Annexe V). Les Aquaporines sont des protéines membranaires qui forment des pores perméables aux molécules d'eau dans les membranes biologiques, sans permettre pour autant les mouvements ioniques. Les gènes *PIP2-1* et *PIP2-5* sont exprimés en réponse au nitrate, tandis que les gènes *SIP1-1* et *NIP6-1* sont réprimés. Ce résultat peut être rapproché de l'augmentation de l'activité de l'invertase vacuolaire 1 au cours du débourrement chez le rosier (Girault *et al.*, 2008, 2010; Rabot *et al.*, 2012). L'expression du gène *RhVII* aboutit à l'augmentation de la pression osmotique et donc de l'appel d'eau vers les cellules en croissance. Cela nécessite des mouvements d'eau qui pourraient se trouver facilités par la production d'aquaporines. L'analyse par q-PCR du niveau d'accumulation des transcrits du gène *PIP2-1* dans le nœud et du gène *RhVII* dans la tige et le bourgeon montrent que :

- le gène *PIP2-1* est stimulé dans les nœuds entre J+0 et J+1 (Figure 61), sans que la composition du milieu n'intervienne (Figure 54 a), invalidant les résultats de RNAseq pour ce gène (Figure 54b). Il est possible que le gène *PIP2-1* ne soit pas le gène codant une aquaporine qui montre le plus de différence d'expression entre les deux conditions contrastées étudiées. Il serait pertinent d'étudier l'expression des autres gènes (*PIP2-5*, *SIP1-1* ou *NIP6-1*) qui ont été retrouvés parmi la liste des 848 séquences isolées en RNAseq.

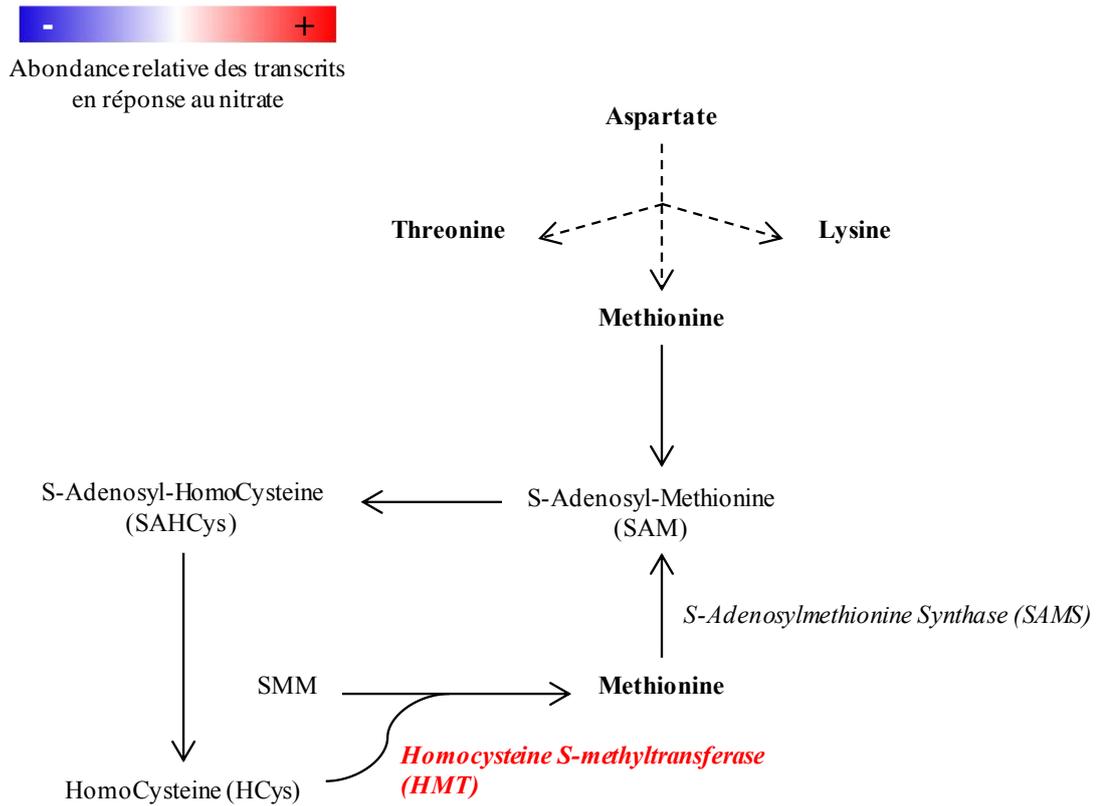
- le gène *RhVII* est fortement exprimé à J+1 dans les bourgeons et la tige en présence de saccharose, notamment dans la tige lorsqu'il est apporté seul (10,9 fois par rapport au milieu de base, Figure 72a). En revanche, l'asparagine apportée seule inhibe l'accumulation des transcrits de ce gène, contrairement au nitrate (Figure 72a). Ainsi, ce gène répond de manière spécifique à la présence simultanée d'asparagine et de saccharose. Cependant, le gène codant l'invertase vacuolaire 1 n'a pas été retrouvé parmi les gènes issus de l'analyse RNASeq, alors que le niveau d'expression de plusieurs gènes du métabolisme de la vacuole identifiés en RNAseq varie en réponse au nitrate.

La proline est un soluté capable de s'accumuler dans la vacuole des cellules pour équilibrer la pression osmotique entre le cytosol et le milieu extracellulaire (Hayat *et al.*, 2012). Plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme de la proline ont été retrouvés parmi la liste des séquences isolées par RNAseq tels que les gènes codant la *P5CS* et la *P5CR* ( $\Delta^1$ -



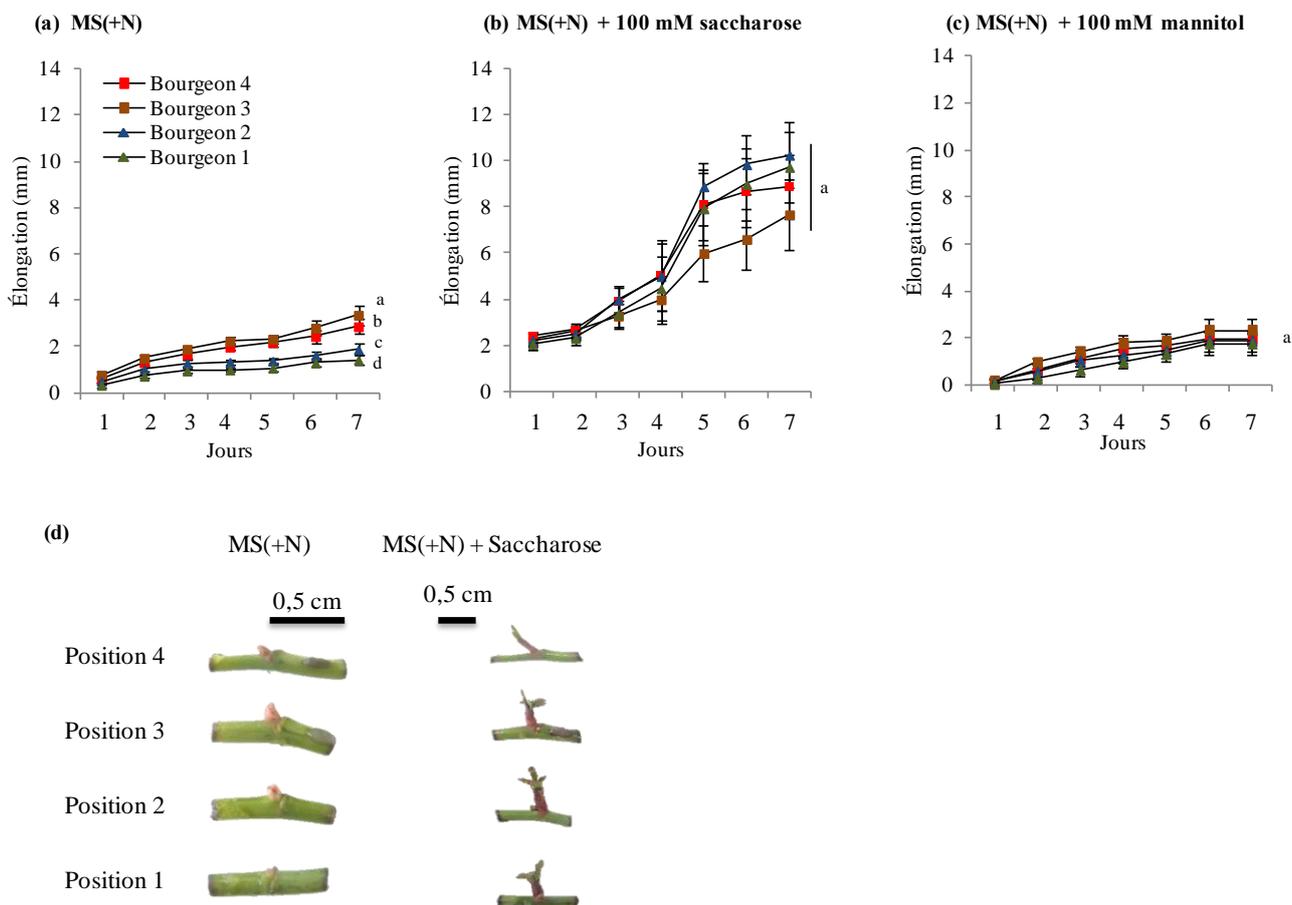
**Figure 74 : variation d'expression des acteurs du métabolisme du glutamate et de la proline identifiés par l'approche RNAseq.**

Les variations d'expression des gènes de cette voie métabolique induites par l'apport de nitrate en présence de saccharose sont indiquées en rouge (sur-expression) ou en bleu (sous-expression). Schéma modifié d'après Pratelli *et al.* (2014).



**Figure 75 : variation d'expression des acteurs du métabolisme de la méthionine identifiés par l'approche RNAseq.**

Les variations d'expression des gènes de cette voie métabolique induites par l'apport de nitrate en présence de saccharose sont indiquées en rouge (sur-expression) ou en bleu (sous-expression). Schéma modifié d'après Pratelli *et al.* (2014).



**Figure 76 : effet de la position initiale du bourgeon sur la cinétique d'allongement des axes II et phénotypes associés à J+7.**

(a) Milieu MS(+N).

(b) Milieu MS(+N) additionné de 100 mM de saccharose.

(c) Milieu MS(+N) additionné de 100 mM de mannitol.

(d) Phénotypes des bourgeons sur milieux MS(+N) et MS(+N) additionné de 100 mM de saccharose. L'échelle est indiquée par les barres noires.

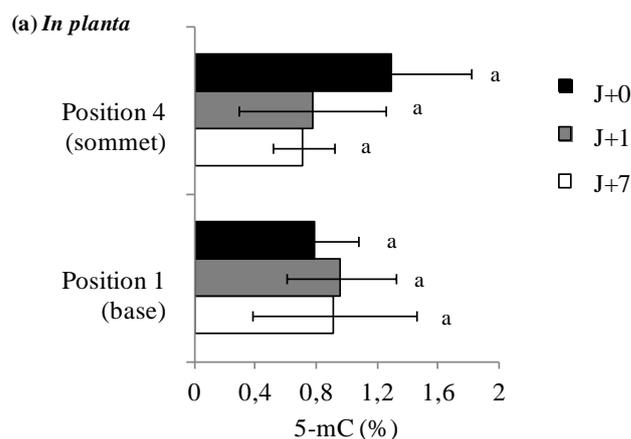
Moyennes de trois expériences indépendantes  $\pm$  les erreurs standards (quand elles sont visibles). Les lettres indiquent les différences significatives entre les différentes conditions de milieu (tests de Student et Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).

Pyrroline-5-Carboxylate Synthase et Réductase, respectivement), et la *ProDH* (Proline déHydrogenase, Figure 74, à droite). L'implication de la proline pour maintenir la pression osmotique dans les tissus en débourrement est en toute logique à rapprocher de l'expression des gènes codant des aquaporines et l'invertase vacuolaire 1. Une convergence certaine est de plus à noter avec nos précédents travaux démontrant une augmentation significative de la concentration en proline entre J+0 et J+7 dans la sève de plantes arrosées tout au long de leur croissance avec une solution nutritive contenant 12 mM de nitrate (57 et 628 pmol.µL<sup>-1</sup> respectivement, traitement N12, Figure 32), conjointement à l'augmentation de la concentration d'asparagine (5974 et 9246 pmol.µL<sup>-1</sup> respectivement).

#### e- La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est une marque épigénétique qui régule l'expression des gènes afin d'adapter le développement des plantes, notamment en réponse à des signaux de l'environnement. Plusieurs gènes codant des enzymes impliquées dans la régulation des marques épigénétiques ont été identifiés par l'analyse RNAseq (catégorie « Transcription », Annexe I). L'expression du gène codant la Homocystéine S-MéthylTransferase (HMT, Figure 75, Pratelli and Pilot, 2014) est 1,7 fois stimulée en présence de nitrate dans le milieu de culture par rapport à la condition de référence (saccharose seul). Cette enzyme intervient dans le métabolisme de la méthionine, acide aminé impliqué dans voie de biosynthèse de la S-Adénosyl-Méthionine (SAM, Figure 75), qui est le donneur de groupement méthyle des ADN Méthyltransférases, substrat de nombreuses réactions, dont les régulations épigénétiques. D'ailleurs un gène codant une ADN Méthyltransférase (*DRMa*, Domains Rearranged Methylase), responsable du transfert des groupements méthyles sur les cytosines de l'ADN pour éteindre les gènes, est fortement (4,75 fois) réprimé en présence de nitrate.

Ces résultats de RNaseq suggèrent l'implication de la méthylation de l'ADN dans le phénomène de débourrement. Pour tester cette hypothèse, nous avons mesuré le niveau de méthylation dans les différentes conditions de culture. Sur le milieu MS(+N) de base qui contient différentes sources d'azote (Tableau 1a), les bourgeons ne sont pas capables de débousser (2,8 mm contre 1,4 mm pour les bourgeons du sommet et de la base respectivement) après sept jours de culture *in vitro* (Figure 76a,d). En présence de 100 mM de saccharose (Figure 76b,d), le débournement est effectif et l'allongement à J+7 est statistiquement similaire entre les axes II issus des bourgeons du sommet et de la base (7,8 mm et 9,20 mm respectivement), sans que ne se manifeste de gradient net d'allongement



(b) *In vitro*

		Réf : MS(+N)	Test : MS(+N) + 100 mM saccharose
J+1	Bourgeon du sommet	1,00	3,83
	Bourgeon de la base	1,00	1,90
J+7	Bourgeon du sommet	1,00	1,48
	Bourgeon de la base	1,00	2,14

**Figure 77 : effet du saccharose sur le niveau de méthylation global du génome des bourgeons.**

(a) Bourgeons maintenus *in planta* le long de l'axe I chez des plantes sous traitements N12. Les valeurs de méthylation sont déterminées par le pourcentage en 5-méthylcytosine dans le génome (5-mC).

(b) Bourgeons prélevés à J+0 le long de l'axe I chez des plantes sous traitements N12 et cultivés *in vitro* pendant 24 heures (J+1) et une semaine (J+7) sur un milieu riche en azote (MS(+N)) complémenté ou non de saccharose (100 mM). Les valeurs de méthylation sont exprimées relativement à la condition MS(+N) prise comme référence.

entre les bourgeons de la base et ceux du sommet. De plus, la croissance des axes II semble s'effectuer à la même vitesse puisque tous les bourgeons ont déboussé en quatre jours (3,3 mm en moyenne à J+4, Figure 76b,d). Le niveau global de méthylation de l'ADN des bourgeons de l'ordre de 1,2%. Ce niveau ne varie ni au cours du déboussé (entre J+0 et J+1), ni au cours de l'allongement des axes II (entre J+1 et J+7), ni en fonction de la position initiale du bourgeon sur l'axe I (entre le sommet et la base, Figure 77), que le déboussé ait eu lieu *in planta* (Figure 77a) ou *in vitro* (Figure 77b). La croissance en présence de saccharose et de l'azote contenu dans le milieu de culture semble associée à une augmentation du niveau global de méthylation de l'ADN (3,8 fois pour le bourgeon du sommet à J+1 par rapport au milieu dépourvu de saccharose), mais qui n'est pas significative. Ces résultats relatifs aux tissus de bourgeons pourraient cependant différer de ceux de la tige, tissus également concernés par les analyses de RNAseq.

## 2- Catégories de gènes dont l'implication est associée à des données bibliographiques

### a- Aspects épigénétiques

Les résultats de RNAseq nous ont permis d'identifier plusieurs autres gènes impliqués dans des phénomènes épigénétiques, dont nous n'avons pas encore validé les variations d'expression. La présence de nitrate en présence de saccharose dans le milieu de culture stimule 1,7 fois l'expression de deux gènes codant des enzymes responsables de la synthèse des histones H2B et H3.3 (catégorie « Transcription », Annexe I), considérés comme des marqueurs de la progression du cycle cellulaire vers la phase S au cours de laquelle a lieu la synthèse d'ADN. En adéquation avec ces gènes, l'approche par RNAseq a permis d'isoler le gène *SplaYeD* (*SYD/BRM/SFN2*), qui est 2,1 fois réprimé en présence de nitrate dans le milieu de culture *in vitro* (catégorie « Transcription », Annexe I). Ce gène est connu pour être associé au remodelage de la chromatine pour lui donner une configuration favorable ou défavorable à l'expression des gènes (communication personnelle, D. Windels, équipe EpiCenter, IRHS). Il code une protéine faisant partie d'un complexe protéique qui participe, au voisinage de nombreux gènes, au recrutement de facteurs de transcription qui régulent leur expression. Chez l'arabette, il est exprimé dans les cellules des méristèmes actifs et est impliqué dans le contrôle de la floraison (stimule les gènes *CO*, *FT* et *SOCI*) et de la croissance des parties aériennes (Wagner and Meyerowitz, 2002; Farrona, 2004). Le gène *WUS* (*WUSCHEL*), impliqué dans la régulation de l'activité méristématique, est connu pour être une des cibles de l'ATPase codée par le gène *SYD* (Kwon *et al.*, 2005).



De plus, trois gènes codant des Histones Méthyltransférases (*ATX2/SDG36*, *ATX3/SDG2* et *SUVH1*, catégorie « Transcription », Annexe I), sont 2,8 fois, 2,5 fois et 1,8 fois réprimés respectivement en présence de nitrate. Ces enzymes sont responsables du transfert des groupements méthyles sur les lysines en positions 4 ou 9 sur la queue des histones de type 3 (positions H3K4 et H3K9 respectivement, Miura *et al.*, 2009; Inagaki *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011). En revanche, les gènes *JMJ25/IBM1* et *JMJ14*, codant des Histones Déméthylases en position H3K4, ont été également retrouvés exprimés préférentiellement au saccharose. Or, la déméthylation des lysines en position H3K4 est nécessaire à la croissance de la tige chez le riz (Chen *et al.*, 2013a). Le gène qui code l'enzyme *JMJ14* est impliqué dans la régulation de la floraison chez l'arabette (Lu *et al.*, 2010).

#### b- Gibbérellines et brassinostéroïdes

Le gène *GA20ox* (« Gibbérelline 20 oxidase 1 »), impliqué dans la production de gibbérellines, est 2,5 fois plus exprimé dans les nœuds cultivés en présence de nitrate (catégorie « Signalisation », Annexe II). En revanche, le gène codant l'ent-kaur-16-ene synthase est 9 fois moins exprimé présence de nitrate qu'il ne l'est dans le milieu de référence. Ce gène permet la conversion d'ent-copalyl diphosphate en ent-kaur-16-ene, le précurseur des gibbérellines, en amont du gène *GA20ox*. Les niveaux d'expression de ces deux gènes sont contradictoires et n'ont pas été étudiés en q-PCR. Leur présence est toute fois en adéquation avec les données bibliographiques établies chez *Rosa hybrida*, mettant en évidence le rôle favorable des gibbérellines sur l'initiation du débourrement en présence de lumière, notamment au travers de la stimulation de l'activité de l'invertase vacuolaire codée par le gène *RhVII* (Choubane *et al.*, 2012).

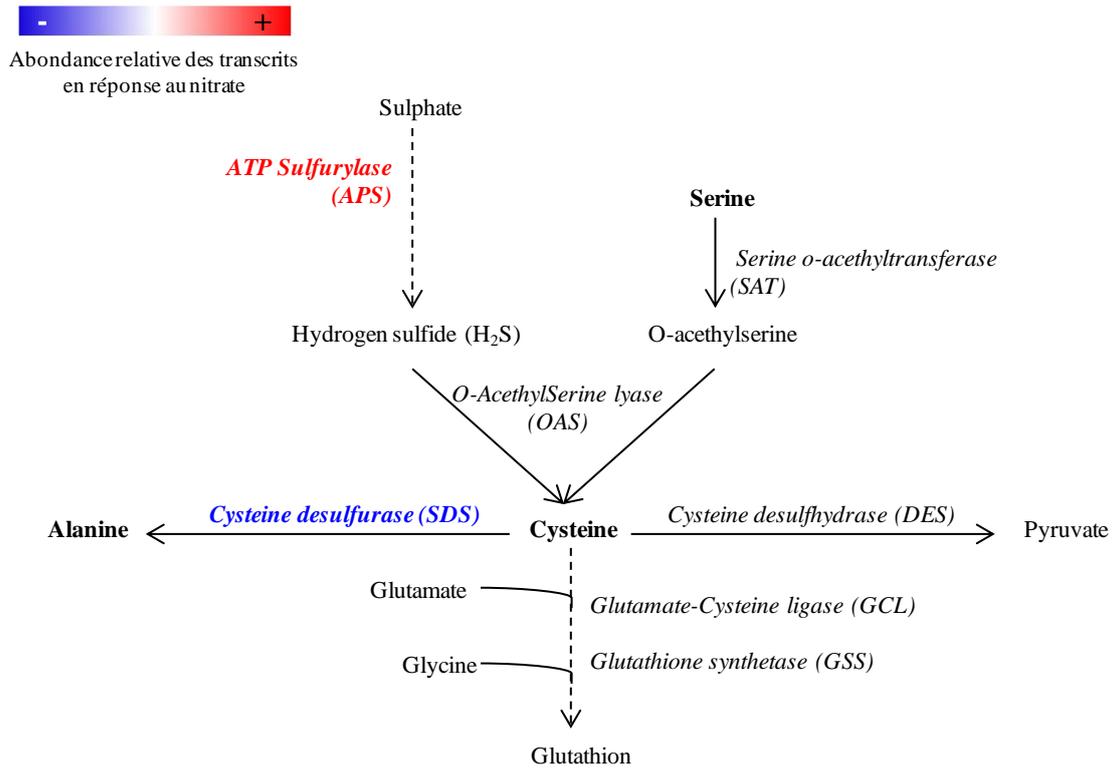
Un gène codant une protéine impliquée dans l'élongation cellulaire (Zurek *et al.*, 1994; Azpiroz *et al.*, 1998) est réprimé en réponse au nitrate en présence de saccharose dans les nœuds à J+1. Ce gène est connu pour être stimulé par les brassinostéroïdes, ce qui suggère que ces régulateurs de croissance sont impliqués dans l'inhibition du débourrement chez le rosier. Or, les brassinostéroïdes sont connus pour réguler l'expansion cellulaire aux côtés de l'auxine dans les plantules, pour stimuler la production des gibbérellines et de cytokinines chez l'arabette (Nemhauser *et al.*, 2004; Kudryakova *et al.*, 2013; Unterholzner *et al.*, 2015), ainsi que pour stimuler l'activité de la Nitrate réductase chez le riz (Anuradha and Rao, 2003). Ainsi, les brassinostéroïdes pourraient être des acteurs importants au cours du débourrement en régulant notamment le métabolisme de l'azote.



### c- Le métabolisme énergétique

La glycolyse prend place dans le cytoplasme. C'est une voie de dégradation du glucose et de production de pyruvate, qui peut être orienté vers la mitochondrie afin d'entrer dans le cycle de Krebs ou être métabolisé dans le cytoplasme par fermentation en anaérobiose. Plusieurs gènes impliqués dans la glycolyse sont réprimés dans les nœuds à J+1 en présence nitrate, tels que ceux codant des ATP-dépendant-6-phosphofructokinases et la Pyruvate kinase (catégorie « Métabolisme énergétique », Annexe VI). En revanche, les gènes codant les PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase et Carboxylase 4 (*PEPCK* et *PEPC4*) sont respectivement stimulés et réprimés en présence de nitrate, ce qui semble logique car leur action est opposée. La PEPC permet de produire de l'oxaloacétate à partir du PhosphoEnolPyruvate. Cet intermédiaire est un carrefour métabolique important qui peut être orienté vers le cycle de Krebs sous la forme de malate, vers la production de PhosphoEnolPyruvate (*PEPCK*) ou vers la production de glutamine et d'aspartate, à partir du glutamate. Ces réactions sont réversibles et pourraient constituer une voie d'entrée pour l'asparagine issue de l'assimilation du nitrate. Cette enzyme pourrait également avoir un rôle dans le maintien du pH cytoplasmique après l'assimilation de l'ammonium libéré à partir de l'asparagine (reviewé par Lea *et al.*, 2001). Chez les plantes herbacées et ligneuses, la synthèse de la *PEPCK* augmente en réponse à l'ammonium et à l'asparagine (Walker *et al.*, 1999, 2001; Chen *et al.*, 2004; Delgado-Alvarado *et al.*, 2007; Famiani *et al.*, 2016; Walker *et al.*, 2016), acide aminé que nous avons trouvé comme étant fortement impliqué dans le débourrement.

La première étape du cycle de Krebs dans les mitochondries consiste à transférer le groupe acétyle de l'acétyl-CoA sur de l'oxaloacétate pour former du citrate. La production d'acétyl-CoA à partir de pyruvate peut résulter de la voie des pentoses phosphates, de la dégradation des lipides ( $\beta$ -oxydation) et de la dégradation des acides aminés. Nous avons trouvé que certains gènes codant des enzymes impliqués dans le cycle de Krebs sont surexprimés en réponse au nitrate, notamment la Malate DésHydrogénase (*MDH*) et l'Isocitrate déshydrogénase. Les électrons à haut potentiel de transfert produits par le cycle de Krebs sont récupérés sur le NADH et l'ubiquinol, et circulent à travers la chaîne respiratoire pour permettre la formation de molécules d'ATP supplémentaires par phosphorylation oxydative. Or, les gènes codant la NADH déshydrogénase, le Cytochrome c et l'ATP synthase ont été retrouvés préférentiellement exprimés à J+1 en présence nitrate, soit dans les tissus destinés à débourrer.



**Figure 78 : variation d'expression des acteurs du métabolisme de la cystéine identifiés par l'approche RNAseq.**

Les variations d'expression des gènes de cette voie métabolique induites par l'apport de nitrate en présence de saccharose sont indiquées en rouge (sur-expression) ou en bleu (sous-expression). Schéma modifié d'après Pratelli *et al.* (2014).

#### d- Stress oxydatif

Plusieurs gènes du cycle du glutathion-ascorbate voient leur expression modifiée en présence de nitrate par rapport à la condition de référence. Les gènes codant l'Ascorbate Peroxydase (*APX*, Groden & Beck, 1979), la MonoDésydro-Ascorbate Réductase (MDAR), et l'Ascorbate Oxydase sont surexprimés en présence de nitrate (1,7 fois, 2,8 fois et 1,7 fois respectivement), alors que le gène codant la Glutathione S-transférase (*GST*) est quant à lui réprimé 2,2 fois (catégorie « Métabolisme du soufre », Annexe III). Ce cycle fait intervenir des antioxydants (ascorbate, glutathion, NADPH) et des enzymes pour détoxifier les cellules des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui pourraient les endommager. En revanche, le gène codant la Glutathion synthétase (Figure 78) n'a pas été retrouvé par l'approche RNAseq.

#### e- Maturation des protéines

L'approche par RNAseq a permis d'isoler plusieurs gènes liés au métabolisme des protéines (catégorie « Métabolisme des protéines », Annexe IV). Parmi eux, nous avons retrouvé différents gènes codant des protéines de choc thermique 70 kDa (HSP) qui sont deux fois plus abondants en présence de nitrate. Les HSP sont des protéines exprimées en réponse à diverses contraintes environnementales (choc thermique, blessures, attaques de pathogènes, application de produits chimiques, *etc.*), notamment dans les bourgeons de pivoine au cours de la phase de transition entre l'endodormance et l'écodormance (Zhang *et al.*, 2015). Certaines protéines HSP sont également connues pour leur rôle de chaperonnes, permettant à d'autres protéines d'achever leur maturation (en particulier le repliement de leurs chaînes polypeptidiques) et ainsi prévenir les dommages potentiellement causés par une perte de fonction protéique due à de mauvais repliements tridimensionnels (Morange, 2000). La production de ces protéines pourrait contribuer au moins en partie au bon fonctionnement des protéines néosynthétisées au cours des premières phases d'allongement des axes II en réponse à la présence simultanée de nitrate et de saccharose.

#### f- La composition des parois

On retrouve plusieurs gènes codant des enzymes impliquées dans le remodelage des parois cellulaires, parmi les séquences issues de l'analyse RNAseq (catégorie « Croissance cellulaire », Annexe V). L'expansion cellulaire, nécessaire à l'allongement des axes II, se réalise en trois parties. i) Après une augmentation de la pression de turgescence, ii) la paroi se relâche sous l'action de plusieurs enzymes : les expansines (EXP), les xyloglucane



endotransglycosylases/hydrolases (XTH) et les  $\beta$ -glucosidases ( $\beta$ -GLU, cellulases ou endoglucanases). Nous avons retrouvé des séquences relatives à chacun de ces types de gènes par l'approche RNAseq. Il semble que les mécanismes de l'expansion cellulaire soient globalement à l'œuvre en réponse au nitrate, soit dans la condition qui permet le débourrement. Nous avons notamment isolé quatre séquences relatives à des gènes codant des expansines, enzymes qui ont la capacité d'induire la relaxation des tensions et l'extension des parois des cellules de façon pH-dépendante (Cosgrove, 1997, catégorie « Croissance cellulaire », Annexe V). Les expansines agissent par rupture des liaisons hydrogènes entre l'hémicellulose et les microfibrilles de cellulose dans la paroi primaire des cellules végétales en extension. Le niveau d'expression de ces gènes est 2,2 fois plus important en réponse au nitrate par rapport à la condition de référence. La stimulation du gène *RhEXP*, codant une expansine, a déjà été associée au débourrement chez le rosier (Girault, 2009). Il est stimulé dans le bourgeon au bout de 6 heures d'exposition à la lumière par rapport à une culture à l'obscurité chez des rosiers décapités et défoliés. Ce gène est également stimulé par un apport de cytokinines de synthèse à l'obscurité. Il a d'ailleurs été démontré que le promoteur de trois gènes codant des expansines sont sous la dépendance des cytokinines et de la lumière (Roman *et al.*, 2016, 2017). iii) La troisième étape de l'expansion cellulaire est relative au dépôt d'éléments pariétaux pour consolider le réseau fibrillaire de la paroi. Nous pouvons par exemple noter la présence de plusieurs séquences relatives à des gènes codant une Cellulose synthase et de la voie de biosynthèse des lignines (*SK*, *EPSPS*, *CM*, *ADT*, *PAL*, *C4H*, *4CL*, *CCR*, *CHS*, *CHI*). Ces séquences sont réprimées à J+1 en réponse au nitrate. Ce résultat est en adéquation avec une étude de transcriptomique réalisée montrant une répression du gène codant la cellulose synthase en réponse à une carence en nitrate chez le concombre (Zhao *et al.*, 2015). La synthèse de davantage de lignines et de cellulose dans les parois des cellules en réponse au saccharose apporté seul dans le milieu de culture pourrait contribuer à rigidifier les tissus et limiterait la capacité des écailles à s'écarter pour permettre le débourrement.



# DISCUSSION GÉNÉRALE



## **I° La disponibilité en nitrate a des effets sur l'architecture et la floraison**

### **1- Nombre de ramifications produites et allongement**

Tous les bourgeons le long de l'axe I sont capables de débourrer lorsque les plantes sont arrosées tout au long de leur croissance avec une solution nutritive riche en nitrate (12 mM, traitement N12, Figure 21). Il existe alors un gradient d'allongement acrotone : les axes II du sommet montrent une croissance et une biomasse plus importante que ceux de la base (Figure 26). Ce phénotype est également obtenu en utilisant une concentration de nitrate plus faible (6 mM) dans la solution nutritive et en jouant sur le moment des apports durant la croissance (traitement N6N0N6, Figure 27). L'allongement des axes II est plus faible en réponse au traitement N6N0N6, comparativement au traitement N12. Cela souligne l'importance de l'apport en nitrate à partir de la décapitation pour alimenter en azote les nouveaux axes II en croissance. Ces résultats sont en accord avec les données bibliographiques, en particulier les travaux de Tagliavini *et al.* (1999) et Thitithanakul *et al.* (2012) qui ont démontrés, chez le pêcher et le peuplier respectivement, qu'un apport d'azote au printemps, soit avant le débourrement, a un effet sur la croissance des axes secondaires. Dans nos conditions, l'apport d'azote en plus faible concentration (6 mM, traitement N6N0N6) de manière tardive, soit au moment de l'initiation du débourrement, permet d'aboutir au même phénotype de débourrement que celui obtenu à la suite d'apports continus et plus élevés (traitement N12), mais l'allongement des axes II est plus faible. Un fort niveau d'apport en azote (nitrate et/ou ammonium) augmente le nombre de bourgeon capables de débourrer chez les plantes ligneuses et herbacées (Lortie and Aarssen, 1997; Furet *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016b) et permet un allongement efficace des axes II qui en sont issus (Médiène *et al.*, 2002; Cline *et al.*, 2006). En revanche, tous les bourgeons situés le long de l'axe I ne débourrent pas de manière homogène lorsque la disponibilité en nitrate est réduite. Un gradient de débourrement (et non plus seulement d'allongement) s'établit alors : les bourgeons du sommet débourrent préférentiellement à ceux de la base (traitements N6N0N0 et N2N0N2, Figures 27 et 28). Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment démontrés chez de jeunes rosiers, dans le cadre d'une croissance en présence d'une faible concentration de nitrate dans la solution nutritive (0,25 mM, Furet *et al.*, 2013). Chez des sujets plus âgés, un apport de nitrate après une carence de plusieurs semaines induit une augmentation du nombre de bourgeons qui débourrent dans les parties médianes et basales de l'axe I (Huché-Thélier *et al.*, 2011).



## 2- Induction de la floraison

La disponibilité en azote est également connue pour réguler la floraison, de différentes manières selon les espèces. Chez la lentille d'eau, une carence en nitrate induit une floraison rapide (Tanaka *et al.*, 1991), tandis qu'elle la retarde chez le lupin (Ma *et al.*, 1997). Dans nos conditions, l'induction de la floraison est retardée lorsque la disponibilité en nitrate dans la solution nutritive diminue (traitements N12, N6N0N6 et N2N0N2), sans affecter cependant la formation de la fleur (Figure 30). L'initiation de la floraison et du débourrement sont deux phénomènes hautement régulés et interconnectés. Il existe chez le rosier deux modes de floraison selon les variétés. La floraison peut se répéter de manière auto-inductive plusieurs fois dans l'année (rosiers remontants) ou constituer un phénomène unique au printemps (typique des variétés anciennes, rosier non-remontant). La remontée de floraison est contrôlée par le gène *RoKSN*, homologue à *TFL1*, qui est récessif *RB* (*Recurrent Blooming*) et présent sous trois formes alléliques (Iwata *et al.*, 2012). Les rosiers sont capables de refleurir lorsque le répresseur de floraison *KSN* n'est pas exprimé. Chez les rosiers non-remontants, les transcrits du gène *RoKSN* sont indétectables avant la première floraison puis leur niveau augmente parallèlement à la baisse de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la floraison (*RoFT*, *RoSOC1* et *RoAPI*, Randoux *et al.*, 2012, 2014). Chez les rosiers remontants, l'allèle est non-fonctionnel. Ainsi, de nouveaux axes II inflorescentiels sont produits même après la première floraison. Au-delà du mode de floraison, le niveau d'expression de ce seul gène conduit à des architectures variées : la phase de juvénilité des rosiers remontants est courte (6-8 semaines, axes fleurissant rapidement), alors qu'elle est longue chez les rosiers non-remontants (1 à 2 ans, axes rampants qui fleurissent tardivement). Ainsi, il serait pertinent d'étudier les variations de niveau d'accumulation des transcrits du gène *RoKSN* au cours du débourrement en réponse à différents apports en nitrate.

## 3- Effets des produits d'assimilation du nitrate sur l'architecture

Seul le bourgeon le plus apical est capable de débourrer et de produire un axe II de faible allongement lorsqu'une forte concentration d'un inhibiteur de l'activité Nitrate réductase est ajoutée dans la solution nutritive (12 mM de tungstate, Figure 31) quelques heures avant l'initiation du débourrement par décapitation de l'apex (J+0). Cela suggère que l'assimilation du nitrate en acides aminés est nécessaire pour stimuler le débourrement des bourgeons de la base, les acides aminés présents dans la plante suffisant par ailleurs pour induire le débourrement du bourgeon apical et permettre un faible allongement de l'axe II. Ainsi,



**l'étude de l'implication des acides aminés dans la mise en place de l'architecture a constitué un point important de ces travaux de recherche.** L'analyse de la quantité d'acides aminés présents dans cet axe II pourrait ainsi donner un ordre d'idée de la quantité nécessaire au débourrement d'un seul bourgeon. Ce résultat n'indique cependant pas si l'inhibition partielle ou totale de l'activité de la Nitrate réductase engendre un défaut en apports en acides aminés pour les besoins nutritionnels et/ou éventuellement une perturbation des évènements de signalisation.

## **II° Effets de la décapitation et la disponibilité en nitrate sur le métabolisme de la plante**

### **1- Évolution de la composition de la sève au cours du débourrement**

Nous avons étudié la variation de la composition de la sève à la sortie des racines au cours du débourrement. La concentration en acides aminés totaux augmente alors que les concentrations en nitrate et ammonium restent faibles dans la sève de plantes dont tous les bourgeons le long de l'axe I sont destinés à produire un axe II. Chez l'épicéa, seules des traces de nitrate et d'ammonium sont également transportées dans la sève (Dambrine *et al.*, 1995). Plusieurs études ont démontré que la concentration d'azote est multipliée par dix dans la sève xylémienne du bouleau durant le débourrement (Millard *et al.*, 1998), essentiellement (95%) sous la forme d'acides aminés (Guak *et al.*, 2003). L'aspartate, la glutamine et l'asparagine sont les acides aminés prédominants dans la sève chez le rosier, comme chez de nombreuses autres espèces ligneuses de la famille des *Rosacées* (poirier, cognassier, prunier myrobolan, pêcher, abricotier, cerisier, pommier, Bollard, 1957). La concentration d'asparagine augmente de 1,5 fois entre J+0 et J+7 en réponse au traitement N12, alors que le nitrate et l'ammonium sont 100 fois moins concentrés. Cela suggère que chez le rosier le nitrate est majoritairement réduit et assimilé en acides aminés dans les racines, comme précédemment décrit chez de nombreuses plantes ligneuses (Tromp & Ova, 1979; Gojon *et al.*, 1994). Cette observation est appuyée par le fait que la concentration en nitrate dans les tissus est 15 fois supérieure à J+7 dans les racines comparativement aux parties aériennes (Figure 36a). Les acides aminés, et notamment l'asparagine, apparaissent donc chez le rosier, comme les principales molécules de transport de l'azote dans la sève en direction des parties aériennes, comme précédemment noté (Sieciechowicz, *et al.*, 1988). L'asparagine, la glutamine et l'aspartate sont bien connus pour constituer les formes principales de transport de l'azote exportées des racines dans la sève, au cours du débourrement printanier chez le pommier, le cerisier et le peuplier (Malaguti *et al.*, 2001; Grassi *et al.*, 2002; Guak *et al.*, 2003), alors que le bouleau et le noyer



ont plutôt recouru à la citrulline et la glutamine (Millard *et al.*, 1998; Frak, 2002). L'asparagine est également la principale espèce azotée transportée dans la sève après un apport d'ammonium chez le citronnier (Kato, 1981), cet acide aminé régulant l'absorption de l'ammonium chez le blé (Causin and Barneix, 1994). Le nitrate est en revanche la principale forme d'azote transportée dans la sève chez le citronnier en réponse à un apport racinaire de nitrate (Kato, 1981). Chez les plantes herbacées, le nitrate est donc la forme prédominante de transport d'azote dans la sève car il est réduit et assimilé en acides aminés dans les parties aériennes (Smirnoff *et al.*, 1984; Gojon *et al.*, 2011). Ainsi, le métabolisme de l'azote dans les racines du rosier semble plus proche de celui des autres plantes ligneuses de la famille des Rosacées que de ceux du citronnier (Rutacées) et des plantes herbacées. Cette augmentation de la concentration de glutamine, d'aspartate et d'asparagine dans la sève au cours du débourrement apparaît transitoire, au moins chez le cerisier et le pommier (diminution de près de 6 fois entre le 10<sup>ème</sup> et le 63<sup>ème</sup> jour suivant le débourrement, Malaguti *et al.*, 2001; Grassi *et al.*, 2002), mais nous n'avons pas porté nos analyses au-delà de J+7.

L'augmentation de la concentration en asparagine et en glutamine est également constatée dans la sève chez les plantes alimentées en nitrate pendant la première semaine d'allongement, après une semaine de carence (traitements N6N0N6 et N2N0N2). En revanche, les concentrations restent 10 fois plus faibles que celles observées en réponse au traitement N12. Ce résultat souligne l'importance de la réduction du nitrate dans l'exportation de ces acides aminés au cours de l'allongement. L'aspartate, le glutamate, la proline et le GABA deviennent les acides aminés majoritairement exportés des racines chez les plantes qui ne reçoivent pas de nitrate après la décapitation (traitement N6N0N0). L'exportation d'aspartate dans la sève est plus importante lorsque le milieu de culture contient peu ou pas de nitrate après la décapitation (traitements N2N0N2 et N6N0N0), alors qu'elle n'augmente pas significativement lorsque les plantes reçoivent un plus fort niveau de nitrate (traitements N12 et N6N0N6). Enfin, la concentration de nitrate, déjà faible à J+0 à l'issue de la semaine de carence, chute significativement au cours de la première semaine d'allongement en réponse au traitement N6N0N0, alors qu'elle se maintient en réponse au traitement N6N0N6. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère que l'identité des acides aminés issus de la réduction et de l'assimilation du nitrate dans les racines et leur niveau d'exportation dans la sève au cours du débourrement sont liés au nombre de bourgeons qui débourent et à l'allongement des axes. **L'asparagine et la glutamine sont majoritaires dans la sève des plantes qui reçoivent du nitrate, alors que l'aspartate et le GABA sont préférentiellement exportés en réponse à**



**une faible disponibilité en nitrate.** Une augmentation des teneurs en GABA a également été mesurée dans les racines après une carence en nitrate chez l'arabette (Krapp *et al.*, 2011).

Le transport à longue distance des acides aminés peut également prendre place dans le phloème afin de distribuer l'azote stocké dans les tissus pour alimenter les axes II en croissance (Tromp and Ovaas, 1971) et de réguler l'absorption racinaire de nitrate (Muller and Touraine, 1992; Geßler *et al.*, 1998, 2003, 2004). Les principaux acides aminés présents dans le phloème sont l'asparagine et la glutamine chez le riz (Hayashi and Chino, 1990), alors que l'asparagine et l'arginine sont prédominants chez le pommier (Tromp and Ovaas, 1971). Le transporteur d'acides aminés AAP2 (Amino Acid Permease 2) est localisé dans le phloème chez l'arabette. Chez les plantes mutantes *aap2*, le niveau de débourrement est élevé mais les teneurs en azote des graines est très bas par rapport au type sauvage. Cela suggère que le transport d'acides aminés dans le phloème est impliqué dans la répartition de l'azote entre les organes puits (Zhang *et al.*, 2010; Kohl *et al.*, 2012). Le transporteur d'acides aminés AAP3 semble être impliqué dans l'alimentation en azote chez le rosier, mais nous n'avons pas confirmé cette hypothèse par q-PCR. De plus, nous n'avons pas étudié séparément la composition de la sève xylémienne et de la sève phloémienne et nous ne pouvons conclure sur leurs rôles spécifiques au cours du débourrement. En revanche, nous avons pu prélever un échantillon de sève au sommet de l'axe I à J+14 en réponse au traitement N6N0N6 (Figure 35). La différence de concentration en acides aminés entre le sommet et la base de la tige représente la part de la mobilisation des parties aériennes (tige et feuilles). Nous proposons que la plus forte concentration d'asparagine dans la sève prélevée au sommet soit au moins en partie impliquée dans l'allongement plus important de l'axe II au voisinage de cette zone de prélèvement par rapport à la base.

Nous avons ensuite déterminé que le flux d'acides aminés dans la sève à la sortie des racines diminue significativement entre J+0 et J+1 chez les plantes décapitées, que les bourgeons soient ou non présents (Figure 33). Il a déjà été démontré qu'une défoliation induit une réduction de l'absorption de l'azote chez le ray-grass (Ourry *et al.*, 1990) et la luzerne (Kim *et al.*, 1992). Chez la chicorée, la suppression des parties aériennes réduit en 3 heures l'activité de la Nitrate réductase de 60 % dans les racines, la quantité de cette enzyme en 12 heures et la production de ses transcrits en quelques jours (Vuylsteker *et al.*, 1997). Cette réponse, bien que caractéristique des effets d'une blessure sur le métabolisme de l'azote, pourrait également être mise en relation avec la suppression de l'apex dans les racines entre J+0 et J+1 chez le rosier. De plus, il est connu que l'auxine en provenance des parties



aériennes stimule la croissance des racines latérales chez l'arabette (Reed *et al.*, 1998). Ainsi, nous proposons que la baisse de la concentration d'auxine, l'effet de la suppression d'un organe puits et/ou l'effet blessure dans les racines, contribue(nt) au moins en partie à la baisse du flux d'acides aminés, notamment du débit, dans la sève prélevée à la base de l'axe I chez les deux séries de rosiers.

Le flux de la sève est significativement plus important chez les plantes décapitées à J+4 par rapport à celui observé à J+0 et à J+1 (Figure 33) et du même ordre de grandeur que la concentration d'acides aminés totaux à J+7 (Figure 32). Cette augmentation du flux s'explique par une augmentation de la concentration et du débit. En revanche, le flux n'augmente pas chez les plantes décapitées dont les bourgeons ont été excisés à la pince : la concentration en acides aminés augmente mais le débit reste faible (Figure 33b). Cela pourrait être l'expression du retrait de la force puits des bourgeons. La baisse du niveau d'auxine induite à J+1 par la décapitation ainsi que l'augmentation de la force puits des bourgeons débouillant à J+4, seraient successivement les éléments moteurs des variations du flux d'acides aminés dans la sève au cours du débourrement. La baisse du flux d'acides aminés dans la sève en réponse à la probable diminution de la teneur en auxine et/ou l'effet blessure dans les racines pourrait constituer un premier indice de l'existence d'un phénomène de signalisation régulant à ce moment la synthèse des acides aminés dans les racines.

## 2- Métabolisme des acides aminés dans les différents organes

La teneur en acides aminés totaux, notamment celle d'asparagine, augmente à la fois dans la sève et dans les différents organes pendant la première semaine qui suit le débourrement en réponse aux différents traitements (Figures 32, 36b et 37). Cette asparagine libre provient des ressources issues de l'assimilation du nitrate dans les racines et/ou des stocks d'azote mobilisés à partir des tissus en réponse à l'initiation de l'allongement des axes II. L'asparagine est probablement exportée dans la sève vers les axes II en croissance, accompagnée d'autres acides aminés minoritaires. Le pic d'asparagine dans les tissus est transitoire puisque les teneurs diminuent au cours de la seconde semaine d'allongement (J+14) pour rejoindre les valeurs mesurées avant la suppression de l'apex (J+0). Nos résultats sont d'ailleurs en accord avec ceux déjà présentés dans la littérature. En effet, les teneurs en acides aminés totaux augmentent transitoirement dans les tissus de la racine pivot (notamment sous forme d'asparagine et d'aspartate) chez la luzerne après la suppression de la partie aérienne (Hendershot and Volenec, 1993; Cunningham and Volenec, 1995; Meuriot *et al.*,



2003), dans les tissus de tige chez le mûrier pendant le débourrement, principalement sous forme d'asparagine (Yamashita, 1986, 1990) et dans les feuilles chez le colza après la suppression des siliques (Lee *et al.*, 2016b). La proline, l'arginine, la glutamine et l'asparagine s'accumulent également dans les tissus pendant la pousse printanière chez 40 espèces de plantes herbacées pérennes (Sagisaka, 1987). En revanche, c'est uniquement un pic d'arginine qui est mesuré dans les tissus de bourgeons au cours du débourrement en avril chez le mandarinier, alors que la teneur en asparagine n'augmente quant à elle qu'une fois que les bourgeons ont débourré en mai (Kato *et al.*, 1984). La baisse des teneurs en asparagine entre J+7 et J+14 dans l'ensemble des organes racinaires et aériens chez le rosier suggère que cet acide aminé est utilisé pendant la croissance, une baisse de la remobilisation et/ou de l'exportation d'acides aminés des racines vers les parties aériennes.

Les teneurs de l'ensemble des acides aminés dans les différents organes sont significativement plus basses pendant la phase d'allongement des axes II (J+7) lorsque les plantes subissent l'un des traitements qui impose une carence en nitrate (N6N0N6 : 231,7 mg.g<sup>-1</sup>, N2N0N2 : 93,4 mg.g<sup>-1</sup>, N6N0N0 : 40,6 mg.g<sup>-1</sup>, Figure 37), par rapport aux plantes qui en reçoivent une forte concentration dans la solution nutritive tout au long de leur culture (N12 : 374,6 mg.g<sup>-1</sup>, Figure 36). Cette différence pourrait au moins en partie expliquer les différentes capacités d'allongement des axes II observées à J+14 pour un même profil de débourrement en réponse aux traitements N12 et N6N0N6. Ces résultats sont en adéquation avec les données bibliographiques. Chez le riz, un faible apport d'azote (nitrate d'ammonium, sulfate d'ammonium ou nitrate de calcium) n'inhibe pas la formation des bourgeons mais, plus tardivement, l'allongement des talles qui en sont issus après le débourrement, ce qui pourrait être lié à une réduction du niveau d'expression des gènes impliqués dans le cycle cellulaire (Luo *et al.*, 2017). L'asparagine représente toujours environ 2/3 de la teneur en acides aminés totaux à J+7 dans les axes II en allongement, quel que soit le traitement (N12, N6N0N6, N2N0N2). Les teneurs restent stables entre J+7 et J+14 en réponse aux traitements N6N0N6 et N2N0N2, dans l'ensemble des organes racinaires et aériens. Il semble que la baisse du niveau et de la disponibilité en nitrate dans la solution nutritive ait prolongé la période au cours de laquelle le métabolisme de l'asparagine augmente chez les plantes sous traitements N6N0N6 et N2N0N2, ce qui pourrait indiquer qu'il faut plus de temps pour accumuler suffisamment d'asparagine pour alimenter le débourrement après une carence. Il est possible que cela corresponde à une compensation et/ou une adaptation à la semaine de carence en nitrate imposée pendant la semaine qui précède la décapitation. Ainsi, l'asparagine



pourrait être un marqueur physiologique du métabolisme azoté pertinent pour apprécier le stade du débourrement des bourgeons et de l'allongement des axes II.

Nous observons un gradient d'asparagine dans la tige d'ordre I à J+0 en réponse au traitement N12. Ces résultats sont en adéquation avec ceux obtenus chez le rosier (traitement N12 également, P.M. Furet, données de thèse non-publiées) et le noyer (Frak *et al.*, 2006). Ces deux études ont montré la présence d'un gradient acropète de la répartition de l'azote dans les feuilles le long de l'axe I : les feuilles du sommet sont les organes puits les plus importants pour l'azote. Ces gradients de répartition d'azote dans les feuilles et d'asparagine dans la tige pourraient prédisposer les plantes avant le débourrement à mobiliser davantage d'asparagine au sommet de l'axe I où les axes II présentent un fort allongement. En revanche, la semaine de carence imposée avant la décapitation dans le cadre des traitements N6N0N6, N6N0N0 et N2N0N2 a réduit la concentration en acides aminés totaux dans la tige à J+0 et suggère que **la présence d'un gradient d'asparagine n'est pas indispensable à J+0 pour mettre en place le gradient d'allongement le long de l'axe I**. Après la première semaine (J+7), la concentration de l'asparagine en réponse au traitement N6N0N0 est très faible dans la tige au voisinage des bourgeons de la base qui ne sont pas capables de débourrer et de ceux du sommet qui produisent des axes II à faible allongement. Dans le cadre du traitement N2N0N2, les teneurs en asparagine sont importantes à la base de la tige au voisinage de l'axe II-3 qui a un allongement très faible et du bourgeon le plus basal qui ne débourre jamais. Ces résultats suggèrent que les teneurs en asparagine dans la tige après une semaine d'allongement ne sont plus corrélées à l'allongement des axes II. Une étude à des temps plus courts du métabolisme de la tige le long de l'axe I permettrait de mieux déterminer les effets des réserves de la tige sur l'allongement. Ces résultats vont à l'encontre de ceux obtenus chez le rhizome du chiendent qui montrent qu'une faible teneur d'azote dans les tissus induit une répartition acropète des niveaux d'asparagine et de glutamine en corrélation avec l'état d'activité des bourgeons (Nigam and McIntyre, 1977).

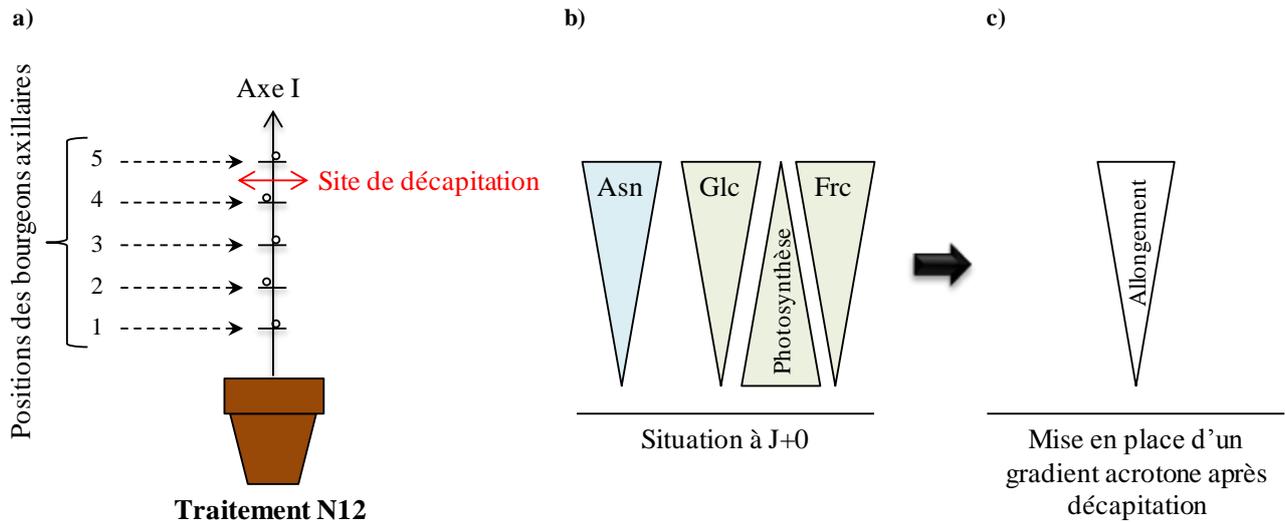
### 3- Photosynthèse et le métabolisme des sucres

Les teneurs en sucres augmentent dans les tissus pendant la première semaine après le débourrement (J+7, Figure 40), de manière conjointe au métabolisme de l'asparagine (Figure 36b). La teneur en saccharose augmente dans les feuilles, alors que l'activité photosynthétique de la feuille en position médiane sur l'axe I reste stable pendant le débourrement chez les plantes sous traitement N12 (communication personnelle, Jérémy



Lothier). Cela suggère que la suppression d'un puits fort (apex) par décapitation provoque une accumulation des sucres dans les feuilles. Cette accumulation n'inhibe pas la photosynthèse chez le rosier. De même, le niveau d'activité photosynthétique n'est pas affecté chez le piment, l'aubergine, le haricot et le ricin, alors qu'il diminue chez le coton, le concombre, le blé et le radis, lorsque les sucres s'accumulent dans les tissus (Azcón-Bieto, 1983; Plaut *et al.*, 1987; Kasai, 2008). Nii (1997) observe également une variation de la teneur en sorbitol et en amidon dans les feuilles de pêchers après la récolte des fruits. Chez le ray-grass, l'activité de la Fructane exohydrolase augmente pendant la repousse après une défoliation, suggérant l'implication des fructanes (homopolymères de fructose liés au résidu fructosyle ou glucosyle d'une molécule de saccharose), et non du saccharose, dans l'alimentation en carbone des nouveaux tissus (Morvan-Bertrand *et al.*, 1999). Les sucres accumulés dans les feuilles après la décapitation chez le rosier pourraient être orientés vers l'alimentation en carbone des axes II en croissance. En effet, la concentration en saccharose augmente dans les axes II entre J+7 et J+14. Ainsi, les métabolismes du saccharose et de l'asparagine diffèrent pendant la seconde semaine d'allongement : la concentration de saccharose se maintient et celle de l'asparagine diminue (J+14). Une augmentation concomitante des concentrations en saccharose et en acides aminés, notamment la glutamine et l'arginine, a déjà été notée dans les bourgeons apicaux d'épicéa (Dhont *et al.*, 2012).

Le niveau de l'activité photosynthétique dépend de l'apport en nitrate, comme cela a été montré chez les plantes ligneuses et herbacées. En effet, plus la teneur globale en azote dans les feuilles est élevée, plus le niveau d'activité photosynthétique est important chez le chénopode blanc et le chêne (Hikosaka *et al.*, 1998). Une carence en nitrate réduit significativement la surface foliaire, la teneur en chlorophylle et le niveau de l'activité photosynthétique chez le mimule glutineux et le sorgho (Gulmon and Chu, 1981; Zhao *et al.*, 2005). Nous retrouvons cette tendance chez le rosier, où l'activité photosynthétique est importante en réponse au traitement N6N0N6, intermédiaire en réponse aux traitements N6N0N0 et N2N0N2, et faible en réponse au traitement N2N0N0 (Figure 43). Lorsque les apports de nitrate sont faibles après la décapitation, l'activité photosynthétique de la feuille de la base diminue au cours de la deuxième semaine d'allongement (J+14). En revanche, et quel que soit le traitement, l'activité photosynthétique de la feuille immature du sommet est faible 10 jours après la décapitation et augmente au cours de son développement pour atteindre des valeurs similaires entre la base et le sommet de la tige après deux semaines d'allongement. Il s'établit donc un gradient basipète d'activité photosynthétique le long de l'axe I, dont le



**Figure 79 : répartition des métabolites le long de l'axe I à J+0.**

(a) Rappel de la localisation *in planta* de la position des bourgeons et du site de décapitation sur l'axe I de plantes sous traitement N12.

(b) Gradients acropètes de la répartition d'asparagine (Asn, triangle bleu), du glucose et du fructose (Glc, Frc respectivement, triangles verts), alors que l'activité photosynthétique des feuilles est basipète.

(c) Mise en place d'un gradient acrotone d'allongement des axes II au cours des premiers jours qui suivent la décapitation.

niveau est régulé par les apports en nitrate et dont l'orientation est inversée par rapport au gradient acropète des teneurs en fructose et en glucose qui s'établissent, quel que soit le traitement, dans la tige le long de l'axe I avant la décapitation (J+0). La Figure 79 résume ces résultats. Au vu de l'ensemble de ces résultats, plusieurs choses sont à noter :

- des redistributions d'azote pourraient prendre place entre les feuilles âgées de la base et celles du sommet, affectant ainsi le potentiel photosynthétique des feuilles.

- les sucres produits au cours de la photosynthèse dans les feuilles de la base pourraient être transportés vers l'apex pour l'alimentation des nouveaux axes II en croissance. Cependant, nous n'avons pas réalisé de marquages au  $^{13}\text{C}$  au cours de ces travaux, qui seuls auraient pu nous renseigner sur l'origine des sucres mobilisés vers les axes II au cours du débourrement.

- les gradients acropètes de la répartition de glucose et fructose dans la tige présentent la même orientation que le gradient des teneurs en carbone dans les feuilles chez le rosier en réponse au traitement N12 (P.M. Furet, données de thèse non-publiées). Ce résultat est en adéquation avec le gradient acropète d'activité de l'ATPase membranaire ( $\text{H}^+$ -ATPase) le long de la tige qui est corrélée avec une plus forte assimilation des sucres présents dans le xylème au voisinage des bourgeons qui débourrent chez le noyer (Alves *et al.*, 2007). Il existe une corrélation entre l'allongement des axes II et la teneur en saccharose dans la sève chez le noyer (Bonhomme *et al.*, 2009).

- outre leur fonction nutritionnelle, les sucres sont des signaux qui stimulent le débourrement (Masson *et al.*, 2014 ; Barbier *et al.*, 2015a). Ainsi, ces résultats suggèrent que les plantes disposent, avant le débourrement, de quantités plus importantes de sucres simples au sommet de l'axe I, au voisinage des bourgeons produisant des axes II à fort allongement : la répartition de ces molécules avant la décapitation pourrait conditionner au moins en partie les bourgeons du sommet à débourrer préférentiellement à ceux de la base, et donc fortement conditionner l'architecture globale des rosiers.

Les teneurs en saccharose sont plus basses en réponse au traitement N6N0N6 par rapport au traitement N12 où les plantes reçoivent une forte concentration de nitrate dans la solution nutritive tout au long de leur culture ( $70 \text{ mg.g}^{-1}$  contre  $110 \text{ mg.g}^{-1}$  respectivement, Figures 40 et 41a). Cette différence pourrait au moins en partie expliquer les différentes



capacités d'allongement des axes II observées à J+14 en réponse aux traitements N12 et N6N0N6, pour un même profil de débourrement.

### **III° La présence simultanée d'asparagine et d'un sucre est nécessaire à l'allongement des axes II cultivés *in vitro***

La biomasse fraîche des axes II produite en une semaine de culture à la lumière augmente significativement avec la taille du fragment de tige sur lequel les bourgeons sont cultivés *in vitro* (Figure 58). Cela suggère qu'une part non-négligeable des molécules présentes dans le fragment de tige contribue à l'alimentation des axes II, au-delà des apports dans le milieu de culture. Ce résultat justifie l'utilisation d'un modèle dans lequel la taille de la portion de tige est réduite à son minimum, sur un milieu de culture de base (MS(-N)) dépourvu de toute source d'azote et de saccharose. Cela a permis d'étudier de manière plus spécifique l'implication des molécules apportées dans le milieu de culture au cours de l'allongement des axes II. Les concentrations choisies pour mener ces travaux ont été associées à celles mesurées dans la sève (Figures 32 et 34) afin de rester proche du contexte physiologique réel.

#### **1- L'asparagine est le principal acide aminé impliqué dans l'alimentation en azote des axes II**

Les bourgeons gonflent mais ne débourrent pas lorsque du saccharose est uniquement apporté dans le milieu, l'azote mobilisé à partir des réserves internes aux tissus étant alors insuffisant (Figure 44b). Dans cette condition, l'allongement est impossible sans la présence d'un apport d'azote dans le milieu de culture, démontrant ainsi l'importance de l'azote dans ce phénomène. En gonflant, les bourgeons deviennent rouges, en adéquation avec la répression des gènes liés à la synthèse de pigments et des composés phénoliques en réponse au nitrate, résultat mis en évidence par l'approche RNAseq (validation par q-PCR, Figures 45, 46, 52 et 54). Ainsi, le saccharose apporté en excès dans le milieu et ne pouvant être utilisé pour soutenir la croissance des axes II en l'absence d'azote, alimente en carbone le métabolisme phénolique, dont la synthèse d'anthocyanes stockés dans les vacuoles des cellules des écailles des bourgeons. Ces pigments constitueraient à la fois un mode de stockage de carbone dans l'attente d'un éventuel apport d'azote pour initier l'allongement des axes II, et limiteraient une production supplémentaire de sucres par photosynthèse (culture en PAR fort) en masquant les pigments chlorophylliens pour protéger les tissus d'un stress oxydant. Cela suggère qu'en l'absence d'une source d'azote apportée dans le milieu de culture, le métabolisme du saccharose est orienté dès J+1 vers la fonction de défense des tissus, au détriment de ses fonctions trophiques dans l'allongement des axes II. Cette



hypothèse s'appuie sur le fait que la signalisation par le saccharose induit une accumulation d'anthocyanes (Solfanelli *et al.*, 2006) pour améliorer la résistance des plantes aux stress biotiques et abiotiques (Van den Ende and El-ESawe, 2014). Ce résultat est également en adéquation avec une étude de transcriptomique réalisée montrant une stimulation des gènes impliqués dans la synthèse des anthocyanes en réponse à une carence en nitrate chez le concombre (Zhao *et al.*, 2015). De plus, il a été montré chez le papayer qu'une augmentation du taux d'anthocyanes dans le pétiole des feuilles est associée au débourrement des bourgeons situés à leur aisselle, en réponse à des stimulations mécaniques répétées quotidiennement (Porter *et al.*, 2009). En revanche, le carbone probablement mobilisé à partir des sucres et de l'amidon stockés dans la tige (Girault *et al.*, 2010) ne suffisent pas à faire gonfler les bourgeons en présence d'azote sans un apport de sucre dans le milieu de culture. Les bourgeons gardent en effet leur couleur et morphologie d'origine (Figure 45).

Aucun allongement des axes II n'a lieu si le milieu ne contient pas simultanément une source d'azote et une source de sucre, pour les différentes concentrations qui ont été testées (milieu MS(-N), 1 à 30 mM pour les sources d'azote, et 1 à 250 mM pour le saccharose, Figures 44, 48, 51 et 52). Ces résultats permettent de compléter le schéma de régulation du débourrement du bourgeon axillaire de rosier élaboré au sein de l'équipe Arch-E sur un milieu riche en azote (« MS(+N) », Henry *et al.*, 2011; Rabot *et al.*, 2012; Choubane *et al.*, 2012; Azri *et al.*, 2015; Barbier *et al.*, 2015a,b) et de souligner l'importance que revêt l'azote dans le débourrement et l'allongement des axes II, conjointement avec un sucre (saccharose, fructose ou glucose). Cependant, toutes les sources d'azote ne sont pas équivalentes au moment du débourrement.

En effet, parmi ces sources, la L-Asparagine est le seul acide aminé capable d'initier à sa concentration physiologique mesurée dans la sève (10 mM environ, Figures 44b, 47) un allongement efficace des axes II en sept jours, en présence de 100 mM de saccharose. Ainsi, l'asparagine est le principal acide aminé impliqué dans l'alimentation en azote des axes II en croissance chez le rosier. **La présence simultanée d'une source de sucre et d'asparagine est nécessaire pour initier l'allongement des axes II chez le rosier.** Chez le peuplier, une goutte de 10 µL d'asparagine (50 mM) apportée quotidiennement directement sur le bourgeon ne permet pas d'aboutir au débourrement. Cela suggère que la tige est l'organe physiologiquement important pour la perception et l'assimilation de l'asparagine en présence de saccharose. Le saccharose et l'asparagine contribuent à la formation des squelettes des nouvelles molécules nécessaires à la croissance des axes II. Chez le pois, une augmentation de



la concentration en asparagine dans le milieu de culture *in vitro* engendre une augmentation de la teneur en azote totale (amides et protéines) pendant la croissance végétative (Haroun *et al.*, 2010).

L'allongement produit au cours de la semaine de culture à la lumière (J+7) est similaire lorsque l'asparagine est associée au saccharose, au fructose ou au glucose. La nature du sucre ne semble pas ainsi être un aspect discriminant. En revanche, de faibles concentrations en saccharose ou de fortes concentrations (non physiologiques) d'asparagine réduisent l'allongement des axes II (4,6 cm à J+7 pour 30 mM d'asparagine et 100 mM de saccharose, 10,2 cm et 5,0 cm à J+7 en présence de 10 mM d'asparagine et de 100 mM et 30 mM de saccharose respectivement). Ces variations d'allongement en réponse aux différentes concentrations d'asparagine ou de sucres suggèrent que la **balance sucres/asparagine, et donc le rapport C/N au niveau cellulaire, est important durant le débourrement et l'allongement des axes II**. Ces résultats sont en adéquation avec les données bibliographiques qui suggèrent qu'un faible rapport C/N dans le méristème apical est propice à la croissance végétative chez de nombreuses espèces, dont la croissance des axes II fait partie intégrante, alors qu'un fort ratio C/N stimule préférentiellement la floraison (Raper *et al.*, 1988; Rideout *et al.*, 1992; Corbesier *et al.*, 2002). L'asparagine possédant intrinsèquement un faible rapport C/N (quatre atomes de carbone et deux atomes d'azote), cet acide aminé pourrait contribuer par ce biais à l'établissement d'un contexte nutritionnel favorable à l'allongement des axes II en présence de saccharose.

La concentration d'asparagine mesurée dans la sève à la sortie des racines à J+7 (environ 10 mM, Figure 32) semble être optimale pour favoriser un allongement efficace des axes II *in vitro*, en nous basant sur la gamme de concentrations testées en présence de 100 mM de saccharose. L'asparagine semble stimuler l'allongement même à la faible concentration de 1 mM, qui correspond à la concentration de la sève prélevée au sommet de l'axe I à J+14 chez des plantes carencées (traitement N6N0N6). Une étude menée chez le lupin et basée sur des marquages au  $^{15}\text{N}$  de l'asparagine et au  $^{13}\text{C}$  du saccharose, a démontré que l'asparagine et le saccharose constituent les formes de transport d'azote et de carbone vers les axes II en croissance (Porter, 1981). L'équipe de Cline *et al.* (2006) a démontré chez le peuplier que la croissance des axes II est améliorée par une aspersion d'asparagine sur le feuillage, soit issue de la mobilisation. De même, une application d'asparagine sur le sol à la fin du mois de décembre stimule la croissance végétative des oliviers au printemps suivant (Proietti and Tombesi, 1996). Chez le pommier, une injection d'une forte concentration d'asparagine



directement dans les vaisseaux vasculaires du tronc permet d'augmenter le nombre de bourgeons qui débourent (Oh and Choi, 1988) Ces quatre études ont été réalisées sur des plantes entières, et donc en présence de sucres endogènes, et suggèrent toutes que l'asparagine est impliquée dans la nutrition en azote des axes II, en adéquation avec nos résultats à des temps courts après le débourrement chez le rosier.

Aux côtés de l'alanine et du glutamate, l'asparagine et la glutamine ( $47,4 \mu\text{mol.g}^{-1}$  MS et  $15,0 \mu\text{mol.g}^{-1}$  MS respectivement à J+1, Figure 56a) sont les acides aminés également abondants dans les tissus de tige au voisinage des bourgeons destinés à produire un axe II à fort allongement (7,72 cm, Figure 44b). Leurs teneurs sont significativement plus élevées dans la tige que dans le bourgeon (1,9 fois et 5,7 fois respectivement, à J+1). Les bourgeons contiennent des acides aminés qui proviennent de l'assimilation du nitrate apporté dans le milieu dès J+1 (nitrate marqué au  $^{15}\text{N}$ , Figure 57). Cela suggère que l'assimilation du nitrate au voisinage du bourgeon est possible *in vitro* pendant les 24 premières heures après la décapitation, et également que l'asparagine n'est pas le seul acide aminé produit à ce point de cinétique et dans cet organe. Environ un quart (24,2%) des molécules d'asparagine ont au moins un atome d'azote issu de l'assimilation du nitrate et une faible proportion (5%) ont les deux atomes marqués au  $^{15}\text{N}$ .

L'aspartate et l'ammonium (précurseurs de l'asparagine) ne sont pas capables d'induire l'allongement des axes II lorsqu'ils ont amenés individuellement ou conjointement dans le milieu en présence de saccharose, quelle que soit leur concentration (Figures 44, 48 et 51). Des études précédentes ont démontré chez l'épicéa que des formes d'azote inorganiques, telles que le nitrate et l'ammonium, sont capables de stimuler le débourrement et d'être assimilées en acides aminés par la voie GS/GOGAT (Thorpe *et al.*, 1989; Bagh *et al.*, 2004), lorsqu'elles sont apportées *in vitro* à des concentrations non-physiologiques et en présence de sucres et de cytokinines (milieu de culture GMD, Mohammed *et al.*, 1986). Chez le riz, le nitrate d'ammonium et le sulfate d'ammonium stimulent la croissance des talles de manière plus importante qu'en réponse au nitrate de calcium (Luo *et al.*, 2017). Cependant, l'ammonium n'est pas capable de stimuler le débourrement chez le rosier, quelle que soit la concentration de saccharose (1 à 100 mM) utilisée conjointement. Le nitrate est en revanche lui capable d'initier le débourrement en présence de saccharose, à des concentrations (10 à 30 mM) cependant éloignées des valeurs physiologiques mesurées dans la sève (Figure 32).



La concentration physiologique de glutamine (3 mM) apportée dans le milieu de culture *in vitro* ne permet pas le débourrement en présence de 100 mM de saccharose (3 mm d'allongement, Figure 48b), alors que les bourgeons débourrent en présence d'une concentration plus faible de saccharose (30 mM et 70 mM, 4,8 et 4,0 mm d'allongement respectivement, Figure 51c). Les bourgeons débourrent et produisent également un axe II court (3.45 mm en moyenne, Figures 44b et 48b) en présence d'une plus forte concentration de glutamine (10 mM) et de 100 mM de saccharose. Dans tous les cas cependant, **l'effet conjoint de la glutamine et du saccharose est moins important que celui obtenu en présence d'asparagine à la concentration physiologique et de saccharose.** Chez le pois, une augmentation de la concentration en glutamine dans le milieu de culture *in vitro* engendre une augmentation de la teneur en azote totale (amides et protéines) pendant la croissance végétative, mais de manière moins efficace que l'asparagine (Haroun *et al.*, 2010). Le rapport C/N intrinsèque de la glutamine est faible mais plus élevé que celui de l'asparagine (5/2 et 4/2 respectivement), ce qui pourrait contribuer à la plus faible efficacité de cet acide aminé pour soutenir la croissance des axes II chez le rosier. Pour des concentrations non-physiologiques, l'ajout conjoint de 10 mM d'aspartate et de 10 mM de glutamine aux 100 mM de saccharose permet d'augmenter légèrement l'allongement mesuré à J+7 (4,1 mm contre 3,7 mm, Figure 48). Le débourrement est inhibé chez le riz lorsque l'activité de la Glutamine synthétase GLNS1.2 est inexistante dans les tissus vasculaires des bourgeons (Ohashi *et al.*, 2015). Cela suggère que l'absence de glutamine inhibe le débourrement en limitant éventuellement la production d'asparagine d'après nos résultats, la glutamine et l'aspartate étant les donneurs des groupements amine et amide. Le gène *GS2*, codant l'enzyme chloroplastique responsable de la production de glutamine en amont de la synthèse d'asparagine, a été isolé par l'approche RNASeq en réponse au nitrate en présence de saccharose. Ce résultat n'a pas été retrouvé à l'échelle du nœud en q-PCR. Cela remet en question le rôle de la glutamine (faux-positif) ou suggère une régulation de l'activité de l'enzyme et non de l'expression du gène qui la code. Nous avons constaté que l'asparagine apportée seule dans le milieu réduit le niveau d'accumulation des transcrits de ce gène à la fois dans la tige et le bourgeon à J+1 et J+7, par rapport au milieu de base à J+1. Le saccharose réduit également l'expression du gène *GS2*, et de manière plus importante lorsqu'il est présent de manière conjointe avec l'asparagine. Cela indique que cet acide aminé pourrait réguler directement ou indirectement le métabolisme d'un de ses précurseurs.



## 2- L'allongement des axes II est possible à l'obscurité en présence d'asparagine et de sucre

Plusieurs études ont démontré l'existence d'interactions entre l'azote et la lumière au cours du débourrement. La disponibilité en nitrate dans la solution nutritive et l'intensité lumineuse régulent de manière synergique le nombre de bourgeons capables de débourrer chez la vigne, le millepertuis et le rosier (Keller and Koblet, 1995; Emarat-Pardaz *et al.*, 2013; Furet *et al.*, 2013). Une forte carence en nitrate réduit l'effet inductif de la lumière chez le rosier (Furet *et al.*, 2013). Cependant, aucune étude à notre connaissance n'a associé l'effet de la lumière sur l'allongement des axes II en présence d'asparagine au cours du débourrement.

Les bourgeons sont capables de produire un axe II de faible allongement à l'obscurité, lorsque le débourrement a été initié à la lumière pendant les 24 premières heures après la mise en culture en présence de saccharose et d'asparagine (J+1, traitement LO, Figure 69). Ces résultats démontrent que **l'assimilation de l'asparagine est possible à l'obscurité pour permettre l'allongement des axes II**, mais ne renseignent pas sur le mode de régulation de l'activité des différentes enzymes en amont de la production d'asparagine, puisque la présence de cet acide aminé dans le milieu de culture permet de passer outre l'activité des enzymes GS/GOGAT/ASNS.

Aucun allongement n'est possible à l'obscurité en présence de nitrate et de saccharose dans le milieu de culture, même si les tissus ont été maintenus à la lumière pendant une journée (16h/8h L/O) pour initier le débourrement. La réduction du nitrate est une réaction stimulée par la lumière, dont l'effet inductif peut être mimé par le saccharose chez l'arabette (Cheng *et al.*, 1992). Les gènes codant les enzymes responsables de l'assimilation du nitrate sont également sous la régulation de la lumière, notamment la GOGAT (Suzuki *et al.*, 2001), la Glutamine synthétase (Tischner and Hüttermann, 1980) et l'Asparagine synthétase. Il existe différents gènes qui codent ces enzymes selon les espèces considérées : deux gènes chez le pois et le lotier (Tsai and Coruzzi, 1991; Waterhouse *et al.*, 1996), trois gènes chez l'arabette et le tournesol (Lam *et al.*, 1994, 1998; Herrera-Rodríguez *et al.*, 2004). Les transcrits du gène codant l'ASNS1 s'accumulent en présence d'un rapport C/N faible : ils sont inhibés par la lumière et par les produits de la photosynthèse, notamment le glucose et le saccharose chez le pois, l'arabette et le maïs (Tsai & Coruzzi, 1990, 1991; Lam *et al.*, 1994; Chevalier *et al.*, 1996; Lam *et al.*, 1998). Ce gène codant l'ASNS1 s'exprime préférentiellement dans les organes non-photosynthétiques ou à l'obscurité. La stimulation de l'activité des enzymes associées à la réduction et l'assimilation du nitrate en acides aminés ne semblant pas efficace



à l'obscurité chez le rosier, ces résultats n'infirmant ni ne confirment la présence de l'isoforme ASNS1 chez cette espèce mais renseignent simplement que les teneurs en asparagine produites et/ou mobilisés à partir des réserves pendant les 16 heures de lumière ne suffisent pas à soutenir la croissance à l'obscurité.

### 3- Les gènes du métabolisme de l'asparagine sont exprimés à J+1 dans les nœuds

À la lumière, nous avons retrouvé à J+1 deux gènes majeurs du métabolisme de l'asparagine parmi les séquences isolées dans les nœuds par l'approche RNAseq. Le gène codant l'asparagine synthétase 2 (*ASNS2*) est surexprimé en réponse au nitrate en présence de saccharose, alors que celui de l'asparaginase (*ASNase2*) est réprimé. Ces résultats ont été confirmés en q-PCR (Figure 54a) dans les mêmes conditions que celles étudiées en RNAseq (Figure 54b). Ainsi, l'asparagine est produite au voisinage des bourgeons qui débourent alors qu'elle est dégradée s'ils sont destinés à rester dormants (schéma intégratif en Figure 80). **Ce résultat est capital puisque nous retrouvons dans quatre expériences conceptuellement différentes (dosages dans la sève, dosages dans les tissus, culture *in vitro*, séquençage des transcrits sans *a priori* par RNAseq) l'implication prédominante du même acide aminé dans le débourrement : l'asparagine est un nouvel acteur clé dans les aspects nutritionnels liés au débourrement.** Dans ce contexte, il est logique de retrouver l'isoforme ASNS2 puisque les transcrits du gène codant cette enzyme s'accumulent à la lumière chez de nombreuses espèces, la voie de signalisation débutant par la perception de la lumière par les phytochromes A (Tsai & Coruzzi, 1990, 1991; Lam *et al.*, 1994; 1998), alors que ce gène n'est pas régulé par la lumière chez le lotier (Waterhouse *et al.*, 1996). Le gène codant l'ASNS2 est impliqué dans l'assimilation de l'asparagine au cours du développement dans le phloème chez l'arabette (Gaufichon *et al.*, 2013), est exprimé spécifiquement dans les racines chez le lotier (Waterhouse *et al.*, 1996) et dans les cotylédons et les nodules chez le pois (Tsai and Coruzzi, 1990). De plus, le débourrement des bourgeons racinaires chez l'euphorbe est associé à une rapide et forte surexpression du gène codant l'asparagine synthase (Horvath *et al.*, 2005). De même, l'activité de l'asparaginase est régulée par la lumière dans les feuilles chez le pois : l'enzyme est active la journée et son activité décroît à l'obscurité (Sieciechowicz, *et al.*, 1985, 1988b).

Au vu de ces résultats, nous avons étudié plus en détails les variations d'accumulation des transcrits des gènes du métabolisme de l'asparagine en présence de saccharose, de nitrate ou



d'asparagine individuellement, ainsi qu'en réponse à la présence simultanée de saccharose et d'une de ces deux sources d'azote.

Le saccharose est individuellement capable de réduire le niveau d'accumulation des transcrits du gène codant l'ASNS2 à la fois dans le bourgeon et la tige par rapport au milieu de base à J+1, et de manière plus efficace lorsqu'il est apporté seul, en adéquation avec les résultats obtenus par l'approche RNAseq. Le saccharose est connu pour contrôler les teneurs en acides aminés, notamment l'asparagine et la proline, en stimulant les gènes impliqués dans leur synthèse (*ASNS1* et *ProDH2*) au travers du facteur de transcription bZIP11 chez l'arabette (Hanson *et al.*, 2007). Le gène *ASNS2* est induit par le glucose et le saccharose, chez l'arabette et le tournesol (Lam *et al.*, 1998; Herrera-Rodríguez *et al.*, 2004). Le saccharose stimule également le gène *ASNS2* dans les racines et les nodules chez le pois (Silvente *et al.*, 2008). Ainsi, en opposition avec les données bibliographiques, il semble que le saccharose réprime la synthèse d'asparagine au cours du débourrement des bourgeons chez le rosier. De plus, le gène *ASNase2* est fortement exprimé dans la tige et le bourgeon en réponse au saccharose seul à J+1 et J+7, par rapport au milieu de base à J+1. Cela suggère que la synthèse de l'enzyme qui dégrade l'asparagine est un des verrous qui limite le débourrement des bourgeons en présence de saccharose et en l'absence d'azote. Cette enzyme limiterait la disponibilité en asparagine nécessaire à l'alimentation en azote des axes II. Ainsi, nous avons démontré que le saccharose régule au moins en partie le niveau d'accumulation des transcrits des gènes du métabolisme de l'asparagine au cours du débourrement. Un dosage de la teneur en asparagine dans les bourgeons cultivés en présence de saccharose devrait permettre de confirmer que l'allongement des axes II est limité par une faible teneur en asparagine dans les tissus, observable au travers d'une baisse des teneurs entre J+1 et J+7.

Concernant les formes minérales d'azote, l'équipe de Wong *et al.* (2004) a démontré que l'induction de l'ASNS2 par la lumière est sous la dépendance de l'ammonium chez l'arabette, contribuant notamment à la détoxification des cellules, et engendre un faible rapport C/N (Ariz *et al.*, 2013). Chez les mutants *asn2-2*, on constate une accumulation d'alanine, de GABA, de pyruvate et de fumarate, suggérant que la formation d'alanine, à partir de glutamate puis de GABA, pour réduire la concentration en ammonium en l'absence de synthèse d'asparagine (Gaufichon *et al.*, 2013). Cela pourrait d'ailleurs expliquer au moins en partie l'implication du GABA dans le débourrement *in vitro* chez le rosier. En effet, le GABA, un acide aminé non-protéino-gène, permet un faible allongement des axes II *in vitro* et pour des concentrations non-physiologiques en présence de saccharose (Figure 44b). Le faible



allongement des axes II mesuré à J+7 suggère que le GABA n'a pas de rôle nutritif. La présence d'un gène codant un transporteur de GABA parmi les 848 séquences isolées par l'approche RNAseq et l'augmentation significative de sa concentration dans la sève à la sortie des racines au cours du débourrement (Figures 32 et 34) sont deux arguments supplémentaires pour impliquer cet acide aminé dans le phénomène de débourrement. Sa présence dans la sève, notamment chez les plantes carencées, suggère que la synthèse d'acides aminés à partir de glutamate (proline, GABA, glutamine, aspartate, asparagine) est essentielle au cours du débourrement. Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux présentés dans la littérature, démontrant l'augmentation de la concentration de GABA dans la sève de noisetier 80 jours après le débourrement (Frak, 2002) et dans les feuilles de soja après la suppression de puits forts tels que les cosses (Turner *et al.*, 2012). Ainsi, il est possible que la suppression de l'apex chez le rosier contribue à la modification à distance du métabolisme de l'azote dans les racines. Or, le GABA est impliqué dans plusieurs phénomènes de signalisation. Un gradient de GABA dans le style des Angiospermes contribue à guider la progression du tube pollinique vers la cavité ovarienne après la pollinisation (Palanivelu *et al.*, 2003). Chez la Phéophycée *Ectocarpus siliculosus*, le GABA serait une molécule de signalisation induite en réponse à un stress salin (Dittami *et al.*, 2011) et à la plupart des *stimuli* environnementaux (Limami and Planchet, 2015). La concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  augmente transitoirement, stimule l'activité de la Glutamate Decarboxylase (GAD) et donc la synthèse de cet acide aminé (Figure 47, Kinnersley & Turano, 2000). Plusieurs études ont également démontré le rôle du GABA dans les interactions entre les métabolismes carboné et azoté, notamment en stimulant de manière précoce la photosynthèse chez le maïs (Li *et al.*, 2016) et des transporteurs d'anions (Bouché and Fromm, 2004; Ramesh *et al.*, 2015). Chez les animaux, le GABA est considéré comme le principal médiateur chimique : il excite les neurones lors de la phase embryonnaire tout en régulant l'activité du cerveau lors de l'adolescence et l'âge adulte. Son rôle est particulièrement étudié chez les patients atteints d'autisme (Tyzio *et al.*, 2006 ; Tyzio *et al.*, 2014). Bien qu'à notre connaissance, aucune étude n'ait jusqu'à ce jour relié le rôle de signal de cet acide aminé au phénomène de débourrement, il apparaît au vu de nos résultats que **le GABA pourrait jouer un rôle de signalisation induisant le débourrement en réponse à une faible disponibilité en azote après la décapitation. Cependant, les expériences menées au cours de ces travaux ont été réalisées dans un contexte nutritionnel, et non pour mettre clairement en évidence un évènement de signalisation par le GABA ou tout autre molécule azotée.** L'ammonium ne permettant pas l'allongement



en présence de saccharose chez le rosier (Figures 44b), son implication dans la régulation de l'ASNS2 n'a pas été abordée par q-PCR.

Le nitrate (10 mM, concentration non-physiologique dans la sève) n'a pas d'effet marqué à J+1 dans la tige et le bourgeon sur le niveau d'expression du gène ASNS2, alors qu'il réprime le gène *ASNase2* (Figure 55, Annexe XVII). La présence simultanée de nitrate et de saccharose inhibe l'expression du gène ASNS2 à J+1 (mais moins que lorsque le saccharose est seul, résultats de RNAseq, Figure 54), ce qui suggère que l'asparagine utilisée dans un premier temps pour la croissance ne provient pas de l'assimilation du nitrate apporté dans le milieu de culture mais plutôt des réserves présentes dans les tissus. En revanche, la présence simultanée de nitrate et de saccharose engendre une augmentation de l'accumulation des transcrits du gène ASNS2 à J+7 dans la tige et les axes II (Figure 55, Annexe XVII, 2,95 fois et 8,36 fois respectivement). Cela confirme que le nitrate est potentiellement réduit et assimilé en asparagine dans la tige et les axes II au cours de leur croissance. Le niveau d'expression du gène codant l'ASNase2 est cependant stimulé dans le bourgeon à J+1 et J+7 par la présence simultanée de nitrate et de saccharose dans le milieu de culture, ce qui entraîne probablement le catabolisme d'une partie de l'asparagine produite. Cela pourrait expliquer le plus faible allongement par rapport à la situation où l'asparagine remplace le nitrate (Figure 44b). De plus, l'utilisation d'une concentration non-physiologique de nitrate suppose que les phénomènes observés sont en partie exacerbés et mettent davantage en valeur les résultats obtenus en présence d'asparagine à la concentration physiologique mesurée dans la sève de plantes en cours de débourrement. De plus, nous savons que l'asparagine est l'acide aminé majoritaire dans les tissus de tige à J+1 en présence de nitrate et de saccharose (Figure 56). Ainsi, il est possible que les effets précédemment décrits soient au moins en partie produits en réponse à la présence d'asparagine issue de la mobilisation des réserves ou de l'assimilation du nitrate. Nous avons donc étudié les variations du niveau d'accumulation des transcrits des gènes ASNS2 et ASNase2 en présence d'asparagine apportée seule dans le milieu et en présence de saccharose.

Les gènes codant l'asparagine synthétase 2 sont réprimés par les acides aminés tels que l'asparagine, la glutamine et le glutamate chez le tournesol et l'arabette (Lam *et al.*, 1998; Herrera-Rodríguez *et al.*, 2004), en réduisant l'effet inductif de la lumière et des sucres. Au contraire chez le rosier, l'asparagine apportée seule dans le milieu de culture (10 mM, concentration physiologique dans la sève) permet de stimuler légèrement le niveau d'expression du gène ASNS2 dans la tige et le bourgeon à J+1 (1,93 fois et 1,57 fois) et



fortement à J+7 (9 fois et 7,6 fois respectivement, Figure 55). L'asparagine réduit à elle seule le niveau d'accumulation des transcrits du gène *ASNase2* à J+1 dans la tige et le bourgeon, et le stimule fortement à J+7 dans la tige, par rapport au milieu de base à J+1. Ainsi, **l'asparagine est capable de réguler son propre métabolisme au cours du débourrement.** Une fois associée au saccharose dans le milieu de culture, l'asparagine maintient un bas niveau d'expression du gène *ASNS2* jusqu'à au moins J+7, notamment dans la tige. Cela est probablement dû au fait que la synthèse de cette enzyme n'est pas utile lorsque l'asparagine est disponible dans le milieu de culture. Le saccharose stimule fortement le niveau d'accumulation des transcrits du gène *ASNase2* par rapport au milieu de base, à la fois dans la tige et le bourgeon à J+1 et J+7. Ainsi, le niveau d'expression du gène codant l'asparaginase est important lorsque les bourgeons gonflent mais ne débourrent pas. Il a également été démontré chez la tomate que le gène codant la L-asparaginase est inhibé chez les plantes hyper-ramifiées en réponse à une forte teneur en ROS entraînée par une baisse de l'activité Rboh (Respiratory burst oxidase homologs, Sagi *et al.*, 2004). Chez le rosier, le gène codant l'asparaginase est légèrement surexprimé dans le bourgeon à J+7 en réponse à la présence simultanée d'asparagine et de saccharose par rapport au milieu de base à J+1. Une étude récente suggère que le métabolisme de l'asparagine est finement régulé au cours du développement du grain chez le riz (Yabuki *et al.*, 2017) : l'activité de l'asparagine synthétase est importante dans les organes source (feuilles), alors que l'activité de l'asparaginase est élevée dans les organes puits (grains en développement) pour permettre l'assimilation de l'asparagine en aspartate. Ainsi, chez le rosier, la légère accumulation des transcrits de l'*ASNase2* dans les axes II (phénotype des bourgeons à J+7, organes puits) dans les conditions favorables au débourrement, marque probablement le début de la fenêtre d'expression de ce gène, permettant l'assimilation de l'asparagine pour alimenter la croissance. Enfin, les niveaux d'accumulation des transcrits des gènes du métabolisme de l'asparagine sont différents en présence de saccharose, d'asparagine ou de ces deux molécules apportées conjointement. Ces résultats mettent à nouveau en valeur l'effet du rapport C/N, spécifiquement le rapport sucre/asparagine, dans la régulation du débourrement chez le rosier.

L'asparagine est une molécule ubiquitaire et une forme importante de transport de l'azote. Cet acide aminé peut participer à de nombreuses réactions :

- la présence simultanée de saccharose et des produits de l'assimilation de l'asparagine (ammonium et aspartate) dans le milieu de culture *in vitro* n'a pas permis d'initier le débourrement, ce qui suggère que la molécule d'asparagine est importante en elle-même dans



le phénomène. L'asparagine peut être utilisée en elle-même dans de nombreuses protéines. i) La croissance des axes II nécessite la production de nouvelles parois cellulaires et donc de protéines structurales contenant de l'asparagine. ii) Cet acide aminé contribue également au renouvellement de la fraction enzymatique indispensable pour permettre l'allongement. iii) Les protéines végétatives de réserve (« VSP » pour Vegetative Storage Proteins) sont riches en glutamine et en asparagine (Skokut *et al.*, 1982). Parmi cette catégorie de protéines, la protéine de réserves dans l'écorce BSP est justement connue pour s'accumuler dans l'apex pendant la formation du bourgeon terminal chez le peuplier (Lawrence *et al.*, 2001).

- l'asparagine peut être hydrolysée dans le cytosol pour former de l'ammonium et de l'aspartate (Figures 12 et 13). Cette réaction est catalysée par l'asparaginase, dont le gène (*ASNase2*) a été retrouvé réprimé en réponse au nitrate en présence de saccharose à J+1 à l'échelle du nœud par l'approche RNAseq (Figures 54 et 55). À partir de cette hydrolyse, plusieurs voies peuvent être empruntées (Figures 11 à 13). Parmi elles : i) l'aspartate peut alors former d'autres acides aminés tels que l'alanine et le glutamate et ii) des précurseurs ou des intermédiaires du cycle de Krebs (pyruvate, oxaloacétate, reviewé dans Gaufichon *et al.*, 2010; Hildebrandt *et al.*, 2015). Le cycle de Krebs permet de produire principalement du pouvoir réducteur (FAD et NADH) utilisé dans la chaîne respiratoire pour former une grande quantité d'ATP nécessaire au déroulement de nombreuses réactions. iii) À l'aide d'asparagine dont le groupement amide est marqué au  $^{15}\text{N}$ , il a été montré chez le pois que cet acide aminé intervient dans le cycle de la photorespiration (Ta *et al.*, 1984), dont les réactions sont mises en œuvre à la suite de l'activité oxygénase de la RuBisCO. Plusieurs séquences relatives au gène qui code cette enzyme ont été isolées par l'approche RNAseq en réponse au nitrate en présence de saccharose, sans fournir d'indice sur l'activité de l'enzyme. Cette voie est connue pour limiter la photosynthèse et pourrait contribuer à l'inhibition de la production de saccharose dans les nœuds cultivés en l'absence d'azote, en adéquation avec la teinte rougeâtre que prennent les tissus à J+1 dans cette condition. Il est possible que la photorespiration, qui consomme de l'ATP et du pouvoir réducteur, réduise la capacité des bourgeons à débourrer. De plus, la photorespiration est indispensable à la fixation de l'azote du sol chez l'arabette (Rachmilevitch *et al.*, 2004). Cela démontre à nouveau les liens entre les métabolismes carboné et azoté. iv) L'asparagine peut également contribuer au cycle de l'urée. Le cycle de l'urée (ou cycle de l'ornithine, catégorie « Métabolisme primaire l'azote, Annexe III) est un cycle de réactions biochimiques survenant dans le cytosol et la mitochondrie et permet de recycler les acides aminés (Wang *et al.*, 2008; Gaufichon *et al.*,



2010; Hildebrandt *et al.*, 2015). Un gène codant une Arginase est préférentiellement exprimé à J+1 dans les tissus dormants, en présence de saccharose (Figure 74). Cette enzyme catalyse l'hydrolyse du groupement guanidinium de l'arginine qui forme l'urée. De plus, trois séquences relatives au gène codant un transporteur d'allantoïne (Uréide Perméase 2) sont préférentiellement exprimées à J+1 en réponse au saccharose et en l'absence de nitrate dans le milieu de culture *in vitro*. L'allantoïne est issue de la dégradation des purines et est un précurseur de l'urée (LeMoine & Walsh, 2015). L'urée est une molécule utilisée dans la composition de nombreux fertilisants qui réduisent la capacité de germination des graines et la croissance de la plantule chez de nombreuses plantes herbacées (Bremner & Krogmeier, 1988). L'urée potentiellement produite en réponse à l'activité de l'arginase pourrait inhiber la capacité des axes II à s'allonger en présence de saccharose et en l'absence de nitrate, et donc d'asparagine, dans le milieu de culture chez le rosier. **Ainsi, le catabolisme de l'asparagine par l'asparaginase, à J+1 dans le bourgeon et la tige en présence de saccharose et à J+7 dans le bourgeon en présence d'asparagine et de saccharose, peut revêtir plusieurs significations biologiques.**

Les rôles essentiels de l'*ASNS2* et de l'*ASNase2* dans l'assimilation du nitrate au cours du débourrement font des gènes qui codent ces enzymes des cibles de choix pour les études d'amélioration variétale qui pourraient permettre de maîtriser l'architecture des plantes sans avoir recourt à des molécules nanifiantes ou des apports excessifs de fertilisants azotés. Jusqu'à présent, ces études ont visé par différentes approches à améliorer l'efficacité globale d'utilisation de l'azote pendant la sénescence, phénomène au cours duquel le métabolisme de l'asparagine est également important (Good *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2012; Thomsen *et al.*, 2014) Chez l'arabette, les effets sur l'architecture des plantes mutantes *asn3-1* et *asn3-2* ont été peu marqués (communication personnelle, Akira Suzuki, IJPB Versailles, Gaufichon *et al.*, 2016), probablement en raison du caractère multigénique de la famille et d'adaptations métaboliques compensant ces mutations. En vue d'éventuellement produire des mutants de rosiers pour chacun des gènes codant les différentes Asparagine synthétases pour observer le phénotype après le débournement, nous avons déterminé que le gène codant l'*ASNS2* se situe sur le contig n°1837 du Groupe de Liaison 5 (LG5) sur la carte génétique SNP haute densité que l'équipe GDO de l'IRHS d'Angers a développée à partir de l'haploïde de *Rosa chinensis* cultivar *Old Blush* (communication personnelle, L. Hibrand Saint-Oyant, équipe Génétique et Diversité des plantes Ornementales). Ce gène est localisé sur le LG3 chez le fraisier, qui se



trouve être l'homologue synténique du LG5 du rosier, d'après une étude récente (Vukosavljev *et al.*, 2016).

#### **IV° L'origine de l'asparagine varie au cours de l'allongement des axes II**

##### **1- Importance du métabolisme des protéines**

Plusieurs études préliminaires menées dans l'équipe Arch-E ont suggéré l'importance de la mobilisation de l'azote présent dans les tissus au cours du débourrement. L'augmentation de la teneur en acides aminés dans la sève totale de plantes sous traitement N12 semble associée à une légère augmentation de l'activité protéolytique dans la feuille au cours du débourrement chez des plantes décapitées au-dessus du phytomère le plus basal (plantes réduites à quatre organes : l'appareil racinaire, une feuille, un entre-nœud et un bourgeon). La teneur en protéines solubles diminue d'environ 30% dans la tige à J+4 de manière concomitante avec une augmentation d'environ 45% de la teneur en acides aminés (F.R. Gousset et K. Magne, stagiaires M1, équipe Arch-E, 2011, données préliminaires non-présentées). De plus, la nature et/ou la concentration des protéines dans les tissus de tige au voisinage immédiat des bourgeons varie au cours du débourrement en réponse au traitement N12, laissant ainsi supposer leur implication dans le mécanisme (T. Durand, équipe Arch-E, 2011, données non-présentées et non-publiées). Enfin, des bourgeons médians excisés de l'axe I ont été cultivés *in vitro* sur un milieu liquide contenant un ensemble d'inhibiteurs de protéases à aspartate, sérine, cystéine (pepstatine, aprotinine et leupeptine respectivement), bien que leur spécificité soit relative. Leur croissance a été réduite de près de 30% par rapport à la condition contrôle sans inhibiteur. L'implication de la protéolyse à des temps courts après la décapitation est marquée par le fait que les teneurs en acides aminés libres, éventuellement stockés dans les vacuoles, sont faibles à J+0 dans l'ensemble des organes (Figure 36). De plus, les teneurs en protéines solubles sont plus importantes dans les feuilles de la base à J+0 par rapport à celles du sommet, en lien avec leur stade de développement. Ces teneurs diminuent légèrement entre J+0 et J+1, sans entraîner de sénescence visible (communication personnelle, V. Billard, équipe Arch-E, données non-présentées, en cours de validation). Les feuilles de la base seraient donc susceptibles de mobiliser plus d'acides aminés vers les bourgeons du sommet. Cette hypothèse est appuyée par les résultats de dosage du seul échantillon de sève prélevé au sommet de l'axe I (traitement N6N0N6 à J+14, Figure 35), qui présente une concentration en acides aminés plus importante au sommet par rapport à la base. Les prélèvements de sève au sommet de l'axe I s'étant avérés complexes, nous prévoyons à l'avenir d'utiliser la technique



qui consiste à plonger la tige ou le pétiole dont on veut récolter la sève dans une solution riche en EDTA (agent chélatant) pour éviter que la blessure ne se referme (King and Zeevaart, 1974; Corbesier *et al.*, 2001; Tetyuk *et al.*, 2013). Ainsi, il est probable que les protéines solubles des feuilles et de la tige, voire les protéines BSP si elles existent chez le rosier, soient dégradées en acides aminés exportés par la sève et mobilisés pour alimenter en azote les axes II en croissance.

## 2- Origines de l'asparagine à J+1

Nos résultats indiquent que l'allongement des axes II *in vitro* à J+7 en présence de sucre est plus important lorsque l'asparagine est utilisée comme source d'azote à la place du nitrate ou de la glutamine dans le milieu gélosé (Figure 44b et 48b, concentrations physiologiques ou non). Il est possible que le temps nécessaire pour mobiliser l'asparagine et/ou initier sa synthèse à partir du nitrate ou de la glutamine explique au moins en partie les différences d'allongement. Les résultats de marquages du  $^{15}\text{N}$  dans les acides aminés dans la tige de nœuds cultivés *in vitro* en présence de nitrate et de saccharose suggèrent qu'une grande majorité des atomes qui composent la glutamine provient de l'assimilation du nitrate apporté dans le milieu de culture, alors que les atomes d'azote de l'asparagine proviennent de la mobilisation des molécules présentes avant l'excision de la plante entière, à un temps précoce en termes d'allongement (J+1, Figure 57). Il est probable que l'asparagine de la tige, soit mobilisée dans les premières heures qui suivent la perception des signaux vers les axes II en croissance, dans lesquels seuls 24,2% de l'asparagine est marquée au  $^{15}\text{N}$ . Dans les mêmes échantillons, les gènes *ASNS2* et *GS2* sont sous-exprimés à J+1 en réponse au nitrate et/ou au saccharose par rapport à la situation où les tissus sont soumis à la dominance apicale *in planta* (J+0, données non-présentées). Les deux modèles comparés (*in planta* à J+0 et *in vitro* à J+1) sont différents mais permettent de relever des tendances de variation d'accumulation des transcrits. L'asparagine qui alimente les axes II en croissance serait peu produite entre J+0 et J+1 et proviendrait essentiellement de la mobilisation des réserves accumulées avant la mise en culture *in vitro* des nœuds. Les faibles niveaux d'expression des gènes *GS2* et *ASNS2* à J+1 pourraient correspondre au début de leurs fenêtres d'expression (Figure 55). En effet, le niveau d'accumulation des transcrits du gène codant l'*ASNS2* est près de 3 fois plus important à J+7 par rapport au milieu de base à J+1 en réponse à la présence simultanée de saccharose et de nitrate. Le nitrate est probablement réduit et assimilé en acides aminés dans la tige entre J+1 et J+7, notamment au travers de l'activité de l'Asparagine synthétase, pour alimenter en asparagine les axes II en croissance.



### 3- Origines de l'azote à J+4 et J+7

Nous avons étudié *in planta* des temps plus tardifs après la décapitation (J+4 et J+7) et démontré que la part de l'absorption courante dans l'alimentation en azote des axes II augmente au cours de leur allongement (60% à J+4 et 85% à J+7, Figure 59a,b). Ces résultats sont en adéquation avec les données bibliographiques de plusieurs espèces de plantes ligneuses chez lesquelles les parts de mobilisation et d'absorption courante dans l'alimentation des nouveaux organes varient au cours du temps après la reprise de croissance printanière (reviewé par (Millard and Grelet, 2010) et chez les plantes herbacées qui mobilisent d'abord leurs réserves avant de débiter l'absorption après une coupe ou une défoliation (Ourry *et al.*, 1988; Avice *et al.*, 1996). Le ratio mobilisation/absorption peut aussi dépendre des espèces, de l'âge des individus, du climat et de la disponibilité en azote avant la récolte des échantillons (Harrison *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2001). En effet, plus les plantes sont âgées et plus leurs capacités de stockage sont importantes (El Zein *et al.*, 2011). Ainsi, la phase de mobilisation est courte dans nos conditions chez le rosier, puisque les sujets sont jeunes et que les apports en nitrate dans la solution nutritive sont suffisants pour fournir un squelette azoté aux molécules impliquées dans l'allongement des axes II. Parmi l'azote quantifié dans ces axes II à l'échelle de la plante entière, l'asparagine provient dans une part importante de l'assimilation du nitrate dans les racines à J+7 (Figure 59c). Un épandage d'asparagine sur le sol, c'est-à-dire comptant comme de l'absorption courante dans les racines, est connu pour améliorer la croissance des axes II et permettre une récolte annuelle chez l'olivier (Proietti and Tombesi, 1996). La pulvérisation d'une solution d'asparagine sur les feuilles, indiquant donc une mobilisation des molécules présentes dans les tissus aériens, permet également une meilleure croissance des axes II chez le peuplier (Cline *et al.*, 2006). Des résultats similaires ont été observés pour le nitrate chez le chanvre (Pal *et al.*, 2013). L'asparagine impliquée dans l'alimentation en azote des axes II peut avoir deux origines dont les parts relatives sont régulées au cours du temps. La réduction et l'assimilation du nitrate en acides aminés a préférentiellement lieu dans les racines chez les plantes ligneuses (Tromp and Ovaas, 1979; Gojon *et al.*, 1994). **La mobilisation de l'asparagine dans les stades précoces après la levée de dominance apicale pourrait ainsi compenser la baisse du flux d'acides aminés dans la sève, notamment leur débit (Figure 33) pendant au moins les 24 premières heures après la décapitation pour alimenter les axes II en azote. L'asparagine proviendrait alors préférentiellement des racines dans les stades plus**



## **tardifs de croissance après le débourrement, où elle serait synthétisée au cours de la réduction et de l'assimilation du nitrate en acides aminés.**

Au-delà des teneurs en acides aminés dans les axes II en réponse aux traitements N12 et N2N0N2 (Figure 39), l'origine de l'asparagine et de la glutamine semble identique entre la base et le sommet (Figure 60). Il reste à déterminer si la différence d'origine des autres précurseurs/produits de l'asparagine (aspartate et ammonium) pourrait être au moins en partie impliquée dans le gradient d'allongement des axes II. Les molécules d'asparagine et de glutamine dans les axes II produits en réponse au traitement N2N0N2 contiennent un atome d'azote issu de l'absorption (Figure 60) et un atome d'azote issu de la remobilisation. Cela suggère que les plantes sont dépendantes pour moitié des apports racinaires pour synthétiser et compenser les faibles réserves internes accumulées avant la décapitation (N2N0N2). Ces réserves internes sont trop faibles pour permettre le débourrement en réponse au traitement N2N0N0, alors qu'elles suffisent à initier un faible allongement en réponse au traitement N6N0N0. Lorsque les plantes ne sont pas carencées pendant leur croissance, la part de l'absorption dans l'alimentation en azote des axes II varie selon l'acide aminé : elle augmente par rapport au traitement N2N0N2 pour la glutamine (100% des molécules ont les deux atomes marqués au  $^{15}\text{N}$ ) et diminue pour l'asparagine (76% des molécules proviennent de l'absorption et 18,3% ont les deux atomes d'azote marqués au  $^{15}\text{N}$ ). Ainsi, la disponibilité en nitrate avant le débourrement conditionne la croissance des axes II et l'importance de la remobilisation de manière spécifique pour chaque acide aminé (Millard and Thomson, 1989; Tagliavini *et al.*, 1999; Gloser, 2005; Dhont, 2005, Thitithanakul *et al.*, 2012; Thitithanakul, 2013).

#### 4- Liens entre la mobilisation des réserves, les régulateurs de croissance et l'asparagine

L'excision des nœuds de la plante-mère permettant de lever la dominance apicale correspond à l'un des premiers signaux perçus par les tissus, au-delà de l'effet blessure. La protéolyse et la mobilisation de l'asparagine pourrait être sous la dépendance de l'auxine, étant donné que le débourrement est impossible en présence d'une concentration inhibitrice d'auxine, de 10 mM d'asparagine et de 100 mM de saccharose (Figure 62).

Les mesures d'allongement à J+7 en fonction de la taille de la tige cultivée *in vitro*, suggèrent que les réserves internes à la tige sont mobilisées et utilisées pour alimenter la croissance des axes II chez le rosier. Nous avons démontré que l'asparagine est capable



d'induire la synthèse des cytokinines dans la tige (Figure 67a). Un apport exogène de cytokinines (BAP, Figure 65) au voisinage de la tige, aboutit à l'issue de la semaine de culture à une croissance cumulée plus importante des axes II. Cela suggère que les cytokinines stimulent les capacités de mobilisation des tissus de tige, comme cela est démontré chez le blé (Criado *et al.*, 2009) et/ou la force puits des axes II (Roitsch and Ehneß, 2000). De plus, ce sont principalement des protéines de réserve de l'écorce, riches en arginine et en asparagine, qui sont dégradées au cours de la pousse printanière chez le pommier (Tromp and Ovaas, 1973; Faye *et al.*, 1989). Ainsi, des liens peuvent être établis entre l'asparagine, les cytokinines et la capacité de mobilisation des tissus.

Au vu de ces résultats, la protéolyse pourrait être régulée par une balance des régulateurs de croissance au cours du débourrement, mais ces aspects n'ont pas été approfondis au cours de ce travail.

## **V° Évolution du statut des régulateurs de croissance dans les différents contextes nutritionnels**

Nous avons démontré l'importance d'un apport simultané d'asparagine et de saccharose pour permettre un allongement efficace des axes II. Nous avons réalisé des q-PCR sur les gènes de trois facteurs de transcription (BRC1, TCP11 et TCP20) et des voies de biosynthèse des principaux régulateurs de croissance (auxine, cytokinines et strigolactones) dans la tige et le bourgeon, ainsi que des dosages de leurs teneurs dans la tige. Cela a permis d'identifier les effets directs ou indirects et individuels et conjoints de l'asparagine et du saccharose, au cours des premières phases d'allongement lorsque l'axe II est encore à l'état de bourgeon (J+1) ou qu'il est visible (J+7).

1- Évènements moléculaires survenant en réponse à la baisse du niveau d'auxine et à la mise en culture

**Acteurs inhibant le débourrement.** Les gènes impliqués dans la synthèse et le transport de l'**auxine** (*YUC1*, *PIN1*) sont inhibés dans la tige à J+1 (Figure 61a), probablement à la suite d'une baisse de la concentration d'auxine dans les tissus (Figure 63c), provoquée par la décapitation (Young *et al.*, 2014), indépendamment de la composition du milieu de culture. Le gène *MAX2* est impliqué dans la signalisation par les **strigolactones** et est associé à l'inhibition du débourrement. L'expression de ce gène ne varie pas dans le bourgeon entre J+0 *in planta* et J+1 *in vitro* sur le milieu de base, ce qui suggère que la signalisation par les



strigolactones n'est pas sous la seule dépendance de la baisse de la concentration d'auxine dans les explants (Figure 61b). Le niveau d'accumulation des transcrits des trois **facteurs de transcription** (BRC1, TCP20 et TCP11) sont également réprimés à la fois dans la tige et le bourgeon entre J+0 *in planta* et J+1 *in vitro* sur le milieu de base (Figure 61).

**Acteurs stimulant le débourrement.** Nous avons démontré que l'expression du gène *IPT3*, impliqué dans la voie de biosynthèse des **cytokinines**, ne varie pas dans la tige entre J+0 *in planta* et J+1 *in vitro* sur le milieu de base (Figure 61a). Ce résultat indique que la synthèse des cytokinines dans la tige au voisinage des bourgeons n'est pas sous la seule dépendance de la baisse de la concentration d'auxine dans les explants, mais dépend également de la composition du milieu de culture *in vitro*. L'expression du gène *ARR5*, impliqué dans la signalisation par les cytokinines pendant le débourrement, est stimulée à J+1 dans la tige et le bourgeon qui sont destinés à débourrer, comparativement à la situation à J+0 *in planta* (Figure 61). Cela suggère que la signalisation par les cytokinines est stimulée au moins en partie par la levée de dominance apicale, en adéquation avec les données bibliographiques (Müller and Leyser, 2011). La stimulation du niveau d'accumulation des transcrits de ce gène est toutefois plus importante sur le milieu de base par rapport aux autres compositions du milieu qui contiennent du nitrate, de l'asparagine et/ou du saccharose. C'est pourquoi, lorsque le milieu de base à J+1 est pris en référence, les résultats relatifs au gène *ARR5* semblent indiquer que la signalisation par les cytokinines est réprimée au cours du débourrement (artefact de présentation des résultats, Figure 67a,b). L'expression du gène *ARR5* est réprimée au cours de l'allongement des axes II (J+7), ce qui suggère que sa fenêtre d'expression est ponctuelle et hautement régulée pendant le débourrement.

## 2- Évènements moléculaires dans la condition permissive

La présence simultanée d'**asparagine et de saccharose** provoque une diminution du niveau d'accumulation des transcrits du gène *YUC1* dans la tige à J+1 et J+7 par rapport au milieu de base à J+1 (Figure 63a), et le réprime également dans le bourgeon/axe II à J+7 (Figure 63b). Nous avons isolé par l'approche RNAseq un gène codant une amidase *AMII*, qui convertit l'indole-3-acetamide en indole-3-acetic acid (Pollmann *et al.*, 2003; Mano & Nemoto, 2012). Ce gène est stimulé 12 fois dans le nœud en réponse au nitrate (et de ses produits d'assimilation tel que l'asparagine, Figure 56) par rapport à la condition de référence (saccharose) et pourrait ainsi compenser la baisse d'expression du gène *YUC1*. Le gène *PINI* est quant à lui stimulé à la fois dans la tige et le bourgeon à J+1 et J+7, ce qui suggère que de



l'auxine potentiellement produite dans les axes II en croissance pourrait être exportée dans la tige pour exercer une dominance sur les bourgeons qui seraient sous-jacents sur l'axe I, dans un contexte de plante entière. Plusieurs séquences isolées en RNAseq et relatives aux gènes codant des transporteurs de nitrate à faible affinité sont surexprimées dans les tissus destinés à débourrer en présence de nitrate et de saccharose. Or, ces transporteurs permettent également la circulation de l'auxine (Krouk *et al.*, 2010), ce qui suggère que le transport de l'auxine pourrait ne pas s'effectuer uniquement au travers des protéines codées par le gène *PIN1*.

Lorsqu'ils sont associés au saccharose, l'asparagine (concentration physiologique) et le nitrate (concentration non-physiologique, Figure 32) permettent une augmentation dans la tige du niveau d'expression du gène *IPT3* (Figure 67a), qui se concrétise par une plus forte teneur en cytokinines dans la tige à J+1 (Figure 67c). Ces réactions se produisent dans le site physiologique de production des cytokinines, tandis que le gène *IPT3* est réprimé dans le bourgeon à J+1 (Figure 67b). Les cytokinines impliquées dans le débourrement des bourgeons axillaires sont produites dans la tige, au voisinage immédiat des bourgeons (Liu *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2015, Roman *et al.*, 2016). L'asparagine issue de l'assimilation du nitrate apporté dans le milieu gélosé ou de la mobilisation des réserves pourrait ainsi contribuer à l'augmentation de l'accumulation des transcrits du gène *IPT3* dans la tige, donc dans le site physiologiquement important. Il a d'autre part été démontré que l'asparagine stimule *in vitro* la synthèse de cytokinines chez le pois (Haroun *et al.*, 2010), au même titre que le saccharose (Barbier *et al.*, 2015). Cette action sur le gène *IPT3* est amplifiée dans la tige lorsque le saccharose et l'asparagine sont présents simultanément dans le milieu de culture. L'allongement des axes II est impossible en présence d'un inhibiteur de la perception des cytokinines, y compris en présence de saccharose et d'asparagine (Figure 65c). Ainsi, l'asparagine et le saccharose pourraient agir en amont de la production des cytokinines, dont la perception est nécessaire à la mise en œuvre des fonctions nutritives de cet acide aminé et des sucres dans les axes II. Dans le contexte de la plante entière, l'asparagine et les sucres simples présents selon un gradient acropète le long de l'axe I pourraient stimuler d'avantage le gène *IPT3* au sommet de la tige (N. El Atba) en adéquation avec le nombre de bourgeons qui débourrent et l'allongement acroton.

Nos résultats de culture *in vitro* montrent que les cytokinines ne permettent pas à elles seules d'initier l'allongement des axes II, mais que leur action nécessite un contexte nutritionnel favorable, notamment la présence simultanée d'une source d'azote et de saccharose (Figure 65). Ce constat renforce l'importance de l'établissement d'un contexte



nutritionnel, voire d'un rapport C/N, favorables au cours du débourrement. Nous avons également constaté que les cytokinines et l'asparagine pourraient réguler mutuellement leur métabolisme. En effet, l'allongement des axes II est réduit en présence de saccharose et d'une plus forte concentration d'asparagine (30 mM) que celle retrouvée dans la sève au cours du débourrement (10 mM environ, Figure 48, à droite). Il a été démontré que les fortes concentrations d'asparagine inhibent la synthèse de cytokinines au cours de la croissance chez le pois (Haroun *et al.*, 2010). La concentration d'asparagine pourrait ainsi contribuer à réguler finement la production des cytokinines au cours du débourrement chez le rosier. De plus, l'allongement est inhibé en présence d'une forte concentration de cytokinines qui proviennent de la production intrinsèque en présence d'asparagine (10 mM) et de saccharose (gène *IPT3*) et de l'apport additionnel de cytokinines de synthèse dans le milieu de culture (BAP 10  $\mu$ M). Dans cette situation, les bourgeons gonflent et produisent des pigments dans leurs écailles (Figures 45, 46 et 52). Cependant, l'utilisation d'une plus faible concentration de cytokinines dans le milieu de culture (1  $\mu$ M) permet de faire débourrer le bourgeon principal et les deux bourgeons collatéraux. Ces derniers seraient donc dans un état de dormance plus profond que le bourgeon principal qui ne pourrait être levé que par une plus forte concentration de cytokinines. La croissance simultanée de ces trois axes II à J+7 est significativement supérieure à l'allongement de l'axe II issu du bourgeon principal en l'absence d'un apport additionnel de cytokinines (Figures 65 et 66f). L'allongement individuel des trois axes II est faible, puisque les ressources nutritives se partagent entre trois puits au lieu d'un seul dans les autres situations. L'ensemble de ces résultats suggère que la concentration en cytokinines régule finement le débourrement chez le rosier, en association avec l'asparagine et le saccharose.

La présence simultanée d'asparagine et de saccharose dans le milieu de culture provoque une forte baisse du niveau d'expression du gène *MAX2* à la fois dans la tige et le bourgeon, à J+1 par rapport au milieu de base. La suppression de la signalisation négative par les strigolactones dans ce contexte nutritionnel pourrait expliquer le débourrement et l'allongement efficace des axes II.

Les gènes codant les facteurs de transcription *BRC1* et *TPC20* sont réprimés en présence d'asparagine et de saccharose à J+1 à la fois dans la tige et le bourgeon, tandis que le niveau d'accumulation des transcrits du gène *TCP11* ne varie pas significativement par rapport au milieu de base. Dans les axes II en croissance à J+7, ces trois gènes *TCP11* et *TCP20* sont réprimés par rapport au milieu de base à J+1, contrairement aux autres compositions de



milieu. Cela pourrait constituer un levier central pour permettre l'allongement. Or, le gène *TCP11*, codant un facteur de transcription de la même famille que *BRC1*, a été isolé par l'approche RNAseq en réponse au nitrate en présence de saccharose, bien que considéré comme faux-positif. Ce facteur de transcription se fixe sur les séquences cibles en collaboration avec le facteur de transcription codé par le gène *TCP20* (communication personnelle, S. Sakr). Il est par ailleurs connu que *TCP20* est impliqué dans la régulation de l'expression de plus de cent gènes en réponse au nitrate dans les racines chez l'arabette (Guan *et al.*, 2014), de manière indépendante et distincte des autres facteurs de transcription tels que les NIN-LIKE PROTEIN *NLP6* et *NLP7* (« nitrate-Ca<sup>2+</sup>-sensor Protein Kinases – NLP signalling », Chardin *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017). Les hétérodimères *TCP20-NLP6/7* s'accumulent dans le noyau en réponse à une carence en nitrate chez l'arabette, de manière coordonnée avec l'inhibition d'un marqueur de la progression du cycle cellulaire (*CYCB1.1*, Guan *et al.*, 2017). Ainsi, il est possible que les gènes *TCP11* et *TCP20* soient des facteurs de transcription impliqués dans les réponses à la disponibilité en azote. Leur répression pourrait être au moins en partie impliquée dans l'initiation du débourrement, conjointement avec le facteur de transcription *BRC1*. En effet, une étude récente a démontré chez le double mutant *brc1-2 brc2-1* que les bourgeons cultivés *in vitro* en présence d'auxine peuvent rester inhibés et sensibles à l'inhibition par la strigolactone chez l'arabette (Seale *et al.*, 2017). À l'inverse, les bourgeons qui surexpriment le gène *BRC1* peuvent être actifs (Seale *et al.*, 2017). Ainsi, les variations de ce gène ne sont pas exclusives et suggèrent l'implication d'autres facteurs de transcription dans la régulation du débourrement.

Le gène *BYPASS1* (*BPS1*) a été isolé par l'approche RNAseq et est 1,9 fois réprimé en réponse au nitrate en présence de saccharose (catégorie « Métabolisme de l'azote », Annexe III). Ce gène est impliqué dans une voie de signalisation complexe entre les racines et les parties aériennes, dont les connaissances sont encore partielles. La croissance globale est affectée chez les mutants *bps1*, en réponse à la production dans les racines d'un signal transmis à l'ensemble de la plante. Ce signal inhibiteur est différent de celui de l'acide abscissique et des strigolactones, puisque des mutations des gènes associés aux dernières étapes de la voie de biosynthèse de ces régulateurs de croissance n'empêchent pas la transmission du signal (Adhikari *et al.*, 2013). Ce signal est connu pour perturber la signalisation par l'auxine et les cytokinines (Sieburth and Lee, 2010; Lee *et al.*, 2012, 2016a), l'activité méristématique (Van Norman *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2016a), le développement des feuilles et l'activité photosynthétique (Van Norman *et al.*, 2011). L'expression du gène *BPS1*



dans nos conditions signifie qu'il n'est pas seulement actif dans les racines et pourrait constituer une des cibles de l'azote, éventuellement l'asparagine, pour réguler le débourrement.

Une fois que le statut des régulateurs de croissance est favorable au débourrement, l'asparagine pourrait être utilisée pour alimenter en azote les axes II. À l'échelle de la plante entière, l'allongement des axes II dépendrait alors de la disponibilité en azote dans l'environnement racinaire et de l'assimilation du nitrate en asparagine. Une fois épuisées les réserves internes à la plante, l'allongement serait stoppé si la carence en nitrate se prolonge. Cette hypothèse est appuyée par la capacité des bourgeons du sommet à débourrer et à produire un axe II de faible allongement en réponse à la décapitation en absence de nitrate dans la solution nutritive (traitement N6N0N0, Figures 27 et 28). Ainsi, **la disponibilité en azote dans la solution nutritive ou le milieu gélosé n'aurait pas d'effet immédiat sur la nature des signaux échangés dans toutes les premières heures qui suivent la décapitation, mais bien uniquement sur l'allongement des axes II.** Pour mieux caractériser ce phénomène, nous prévoyons de cultiver *in vitro* des nœuds prélevés sur des plantes sous traitement N2N0 et N12 respectivement, en présence de nitrate, de saccharose, voire d'inhibiteurs de protéases. Un suivi de cinétique de croissance devrait permettre de déterminer si la faible capacité de mobilisation des réserves de la tige retarde l'initiation du débourrement et a des conséquences sur la production de l'axe II.

### 3- Évènements moléculaires en présence de saccharose

Les gènes *YUC1* et *PINI* sont légèrement stimulés dans le bourgeon et la tige à J+1 en présence de saccharose par rapport au milieu de base. Ainsi, le transport d'auxine reste possible en présence de saccharose, et ne semble donc pas être un frein au débourrement malgré le phénotype à J+7.

Le saccharose engendre à lui seul une forte accumulation des transcrits du gène *IPT3* dans la tige et le réprime dans le bourgeon à J+1 par rapport au milieu de base. La présence du saccharose dans la tige limite les effets inhibiteurs du nitrate et de l'asparagine apportés seuls dans le milieu de culture sur le niveau d'accumulation des transcrits du gène *ARR5*, impliqué dans la signalisation par les cytokinines. Cela suggère que le saccharose est fortement impliqué dans le métabolisme des cytokinines, en adéquation avec la littérature (Barbier *et al.*, 2015a).



Le saccharose réduit de manière plus importante le niveau d'accumulation du gène *MAX2* à la fois dans la tige et le bourgeon à J+1 et J+7 par rapport au milieu de base à J+1. Ainsi, l'inhibition de la signalisation par les strigolactones en réponse au saccharose ne semble pas constituer le frein principal au débourrement dans cette condition, en adéquation avec les données bibliographiques (Barbier *et al.*, 2015a). Nous n'avons pas retrouvé ce gène parmi la liste des 848 séquences isolées en RNAseq en réponse au nitrate en présence de saccharose, probablement dû au fait que le saccharose engendre à lui seul un niveau d'expression bas, qu'il soit associé ou non à une source d'azote. Par ailleurs, il est connu qu'une carence en azote engendre la production de strigolactones dans les bourgeons chez le riz (Luo *et al.*, 2017). Ainsi, l'azote des tissus ne suffit pas à faire évoluer l'effet inhibiteur du saccharose sur le gène *MAX2*.

Le saccharose engendre une diminution de l'accumulation des transcrits des gènes codant les facteurs de transcription *BRC1* et *TCP20* dans le bourgeon à J+1 et J+7. Cependant, l'expression du gène *TCP11* augmente dans la tige à J+1, ce qui pourrait contribuer au maintien de l'état de dormance des tissus dans cette condition.

Les bourgeons cultivés en présence de saccharose gonflent, produisent des pigments (gène *LDOX*) mais ne débourrent pas en l'absence d'asparagine. Parmi les treize gènes étudiés appartenant aux métabolismes des régulateurs de croissance (*YUC1*, *PINI*, *IPT3*, *ARR5*, *MAX2*), des facteurs de transcription (*BRC1*, *TCP11*, *TCP20*), et des nutriments carbonés et azotés (*RhSUC2*, *RhVII*, *ASNS2*, *ASNase2*, *GS2*), nous avons noté que **trois gènes seulement présentent des orientations d'expression opposées dans la tige à J+1 entre la condition permissive et la condition où le saccharose est apporté seul (*BRC1*, *TCP11* et *ASNase2*)**. Ces résultats confortent de manière importante la prédominance de l'asparagine dans le phénomène de débourrement.

#### 4- Évènements moléculaires en présence d'asparagine

Les gènes *YUC1* et *PINI* sont réprimés à J+1 en présence d'asparagine dans la tige et le bourgeon par rapport au milieu de base. L'absence de synthèse et de transport d'auxine dans les premières qui suivent la levée de dominance apicale pourrait constituer un des freins au débourrement dans cette condition. De plus, la seule présence d'asparagine, associée ou non à du saccharose, provoque une diminution plus importante des teneurs en auxine dans la tige entre J+0 et J+1 que les autres compositions de milieu.



Le nitrate et les cytokinines, sont connus pour inhiber l'expression des gènes liés à la synthèse et à la signalisation des strigolactones dans les racines et la tige chez l'arabette et le riz (Stirnberg *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2015). En effet, le nitrate et l'asparagine engendrent individuellement (directement ou indirectement) une réduction de l'accumulation des transcrits du gène *MAX2* dans le bourgeon à J+1 par rapport au milieu de base, et n'ont pas d'effet dans la tige. Ce gène est en revanche stimulé dans les bourgeons qui n'ont pas débouffés à J+7 en l'absence de saccharose. Ainsi, la transmission de ce signal pourrait être un frein au débouffement dans ces conditions.

Une étude récente a démontré que le nitrate stimule l'expression du gène codant le miR393 qui inhibe l'expression du gène *BRC1* (Li *et al.*, 2016). Ce dernier code un facteur de transcription impliqué dans l'inhibition du débouffement. Cela est en adéquation avec nos résultats de q-PCR qui montrent que le nitrate seul provoque l'accumulation des transcrits du gène *BRC1* à J+1 et J+7 dans la tige par rapport au milieu de base. Ce gène est en revanche réprimé dans le bourgeon et la tige à J+1 en réponse à l'asparagine apportée seule dans le milieu de culture. Cela démontre que le nitrate et l'asparagine peuvent avoir des effets directs ou indirects différents sur le niveau d'expression des gènes au cours du débouffement.

La présence de nitrate (concentration non-physiologique) ou d'asparagine (concentration physiologique) aboutit à la répression de la signalisation par les cytokinines à la fois dans la tige et le bourgeon à J+1 et J+7 par rapport au milieu de base à J+1. Ces résultats sont en opposition avec ceux de la littérature ayant démontré le rôle du nitrate, et pas de l'ammonium, dans la stimulation de ce gène dans différents contextes biologiques (Sakakibara *et al.*, 1998; Shtratnikova *et al.*, 2015).

L'asparagine et le nitrate induisent (directement ou indirectement) individuellement la synthèse de cytokinines, au travers de l'expression du gène *IPT3*, en adéquation avec les données bibliographiques précédemment présentées. Leur effet direct ou indirect est plus important en présence de saccharose. Chez le riz, le prétraitement des racines avec la L-méthionine sulfoximine, un inhibiteur de l'activité de la glutamine synthétase, a supprimé l'induction des gènes *OsIPT4* et *OsIPT5* dépendants du nitrate et de l'ammonium, alors que l'application de la glutamine a induit leur expression. Ainsi, contrairement au nitrate et à l'ammonium, la glutamine ou un métabolite apparenté (d'après les auteurs), est un métabolite essentiel pour l'induction de ces gènes *IPT* chez le riz (Kamada-Nobusada *et al.*, 2013, Ohashi *et al.*, 2015, 2017). De même, l'induction du gène *IPT4* est également sous la dépendance de



la glutamine chez l'arabette (Kamada-Nobusada *et al.*, 2013). **Ces résultats laissent entendre que l'asparagine, au même titre que la glutamine dans un contexte physiologique plus général que le débourrement, pourrait être un métabolite capable de stimuler directement l'expression des cytokinines et avoir donc un double rôle de métabolite-signal au cours du débourrement.** En effet, l'asparagine est connue pour jouer un rôle de régulation dans de nombreux phénomènes biologiques, tels que les interactions plante-pathogène (Yang *et al.*, 2005), de l'activité Nitrate réductase dans les racines (Muller and Touraine, 1992), la production de nodosités chez les Fabacées (Suliman and Tran, 2013; Bobille *et al.*, 2016), l'accumulation de protéines de réserves dans les graines de soja (Hernandez-Sebastia, 2005). L'asparagine est également un signal chez l'animal dans le contexte du cancer du sang (Loayza-Puch *et al.*, 2016; Krall *et al.*, 2016). Le dépôt d'une goutte d'asparagine directement sur le bourgeon ne permet pas le débourrement chez le peuplier (Cline *et al.*, 2006), ce qui suggère que l'évènement de signalisation en réponse à l'asparagine surviendrait plutôt dans la tige, qui est le site physiologiquement important de production des cytokinines, en adéquation avec nos résultats relatifs à son origine à J+1. Cependant, **les expériences menées au cours de ces travaux ont été réalisées dans un contexte nutritionnel, et non pour mettre clairement en évidence un évènement de signalisation par l'asparagine.**

##### 5- Modalités des effets du saccharose et de l'asparagine

Le saccharose et l'asparagine ne semblent pas avoir d'effets (directs ou indirects) homogènes sur les gènes impliqués dans le débourrement. Ces modalités, qui ne s'excluent pas entre elles, peuvent évoluer au cours du temps et selon le tissu considéré (tige et bourgeon) pour lever les verrous inhérents à chaque organe :

- le sucre et l'asparagine sont susceptibles d'agir individuellement sur des acteurs différents simultanément ou de manière légèrement différée. Par exemple, l'asparagine seule inhibe le niveau d'accumulation des transcrits du gène *BRC1* à J+1 dans la tige, alors que le saccharose n'a pas d'effet (Figure 64a). En revanche, le saccharose stimule l'expression du gène *TCP11*, alors que l'asparagine n'a pas d'effet significatif (Figure 64a).

- le sucre et l'asparagine sont susceptibles d'agir individuellement sur un même acteur, de manière séquentielle (l'un après l'autre, dans un ordre encore indéfini) ou de manière simultanée. Leur effet individuel sur le niveau d'accumulation des transcrits du gène peut être



plus important lorsque les deux molécules sont présentes simultanément dans le milieu de culture, comme dans le cas d'*IPT3* dans la tige à J+1 (Figure 67, Annexe XV) et de *TCP20* et *BRC1* dans le bourgeon à J+1 (Figure 64b). À l'inverse, si les effets individuels du sucre et de l'asparagine apportés individuellement sont opposés, le niveau d'accumulation des transcrits du gène concerné semble moyenné lorsque les deux molécules sont présentes simultanément dans le milieu de culture, comme dans le cas des gènes *YUC1* et *PINI* dans le bourgeon à J+1 (Figure 63b).

## 6- Implication d'une composante épigénétique dans le débourrement

Le contrôle de l'expression des gènes impliqués dans le débourrement peut s'opérer de diverses manières, et les marques épigénétiques représentent un premier niveau de régulation. Ces marques sont sensibles aux variations des conditions environnementales et permettent aux plantes d'adapter leurs réponses. Les gènes codant les enzymes responsables de leur synthèse, de leur maintien ou de leur dégradation seraient ainsi des cibles de choix pour les signaux survenant dans les stades précoces du débourrement. Nous avons isolé plusieurs gènes liés à différentes marques épigénétiques par une approche sans *a priori* (RNAseq) :

**La méthylation de l'ADN.** Nous avons démontré que le niveau global de méthylation de l'ADN des bourgeons ne varie pas au cours du débourrement, quelle que soit leur position sur l'axe I (Figure 77), en opposition avec les résultats publiés chez la betterave sucrière et le pommier (Causevic *et al.*, 2005; Trap-Gentil *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2016). Ce niveau global de méthylation de l'ADN, de l'ordre de 1,2% dans les bourgeons / axes II à la fois *in planta* et *in vitro*, est faible comparativement aux mesures réalisées chez d'autres espèces : le génome de l'arabette contient 5 à 6% de cytosine méthylée (Cokus *et al.*, 2008), plus de 30% chez la tomate (Teyssier *et al.*, 2008), 28% chez la betterave (Causevic *et al.*, 2005) et 25% chez le coton (Osabe *et al.*, 2014). Le saccharose ne semble pas capable de modifier significativement le niveau de méthylation de l'ADN des bourgeons cultivés *in vitro*. Pourtant, le saccharose est connu pour modifier le niveau de méthylation du promoteur du gène impliqué dans la synthèse de pro-opiomélanocortine, un précurseur protéique de très nombreuses hormones polypeptidiques, dans l'hypothalamus chez les souris (Zheng *et al.*, 2015; Zhang, 2015). Cependant, l'inhibition du gène codant l'ADN Méthyltransférase *DRMa* en réponse au nitrate en présence de saccharose, suggère que la méthylation de l'ADN pourrait être impliquée dans la répression des gènes qui pourraient être favorables au débourrement à l'échelle du nœud cultivé *in vitro*. Ce résultat est en adéquation avec ceux de



Kankel *et al.* (2003) démontrant l'implication du gène codant l'ADN Méthyltransférase *MET1* dans la mise en place de l'architecture chez l'arabette. Le mutant *met1-1* présente en effet un phénotype hyper ramifié, une augmentation de la production de feuilles au niveau de la rosette et un retard de l'initiation florale.

Au vu de ces résultats, il est important de noter que :

- la détermination du niveau global de méthylation de l'ADN (Figure 77) et le séquençage à haut débit des transcrits (RNAseq) sont deux techniques sans *a priori*, qui ne renseignent pas sur les variations de l'état de méthylation de la séquence promotrice de gènes clés. Il est possible que des variations ponctuelles et discrètes du statut épigénétique de certains gènes suffisent à initier ou réprimer le débourrement des bourgeons et l'allongement des axes II qui en sont issus. Pour étudier l'évolution de l'état de méthylation de l'ensemble des cytosines du génome, il faut procéder à des séquençages au bisulfite (Kumar *et al.*, 2016). Il est également possible d'étudier l'évolution de l'état de méthylation d'une cytosine précise, par PCR après digestion de la séquence à amplifier par des enzymes isoschizomères sensibles à l'état de méthylation de leur site de restriction (MS-PCR pour « Methyl Sensitive PCR », (Causevic *et al.*, 2005; Trap-Gentil *et al.*, 2011), en s'intéressant aux promoteurs de gènes clés impliqués dans le débourrement. Nous avons mené quelques essais sur le promoteur du gène qui code un transporteur de saccharose au cours du débourrement dans les bourgeons (RhSUC2, Henry *et al.*, 2011), qui se sont révélés non-concluants (données non-présentées). Il serait désormais plus pertinent d'étudier les variations du niveau de méthylation du promoteur et/ou de la séquence codante des gènes *ASNS2* et *ASNase2*. Il est déjà connu que la déméthylation des cytosines du promoteur du gène codant l'Asparagine synthétase est à l'origine de sa surexpression chez l'humain (Ren *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2005; Akagi *et al.*, 2006), l'accumulation d'asparagine dans les cellules entraînant la prolifération cellulaire à l'origine du cancer du sang. Les lignées de cellules résistantes au traitement à base d'Asparaginase sont assainies avec un inhibiteur de la synthèse d'asparagine à base de sulfoximine, Gutierrez *et al.*, 2006; Ikeuchi *et al.*, 2012). Ainsi, il est envisageable que l'augmentation du niveau d'expression du gène codant l'Asparagine synthétase soit une des conséquences de la déméthylation de sa séquence au cours du débourrement chez le rosier, sans que des variations à l'échelle du génome soient perceptibles.

- nous n'avons pas analysé la variation du niveau des marques épigénétiques dans les tissus de tige de manière spécifique, ni en réponse à l'azote (culture sur le milieu MS(+N)



riche en nitrate, ammonium et glycine). Les résultats obtenus en RNAseq correspondent à l'expression des gènes pour l'ensemble du nœud (tige et bourgeon confondus) et en réponse au nitrate en présence de saccharose (culture sur le milieu MS(-N) initialement dépourvu de toute source d'azote). Il est possible que les variations les plus importantes surviennent non pas dans le bourgeon mais dans la tige à leur voisinage. Ainsi, une analyse des variations du niveau de méthylation de l'ADN de la tige est à prévoir, en faisant varier la concentration en azote, notamment en asparagine, dans le milieu de culture *in vitro* MS(-N).

**La méthylation des lysines de la queue des histones.** Plusieurs gènes codant des Histones méthyltransférases (*ATX2/SDG36* et *ATX3/SDG2*, en position H3K4) et des Histones déméthylases (*JMJ25/IBM1* et *JMJ14*, en position H3K4) ont été isolés par l'approche RNAseq. Cela suggère que cette marque épigénétique est hautement régulée à J+1 dans le nœud en réponse au nitrate au cours du débourrement chez le rosier, sans apporter plus de précisions relatives aux métabolismes spécifiques de la tige et du bourgeon. L'équipe de Lu *et al.* (2008) a en effet démontré que les gènes *JMJ* et *SDG* sont antagonistes chez le riz et l'arabette. La présence de ces gènes impliqués dans la méthylation des histones est en revanche en adéquation avec les données bibliographiques obtenues chez l'arabette : la perte d'activité de l'Histone méthyltransférase SDG8 aboutit à l'augmentation du nombre de ramifications chez le mutant *sdg8-4* (Dong *et al.*, 2008), et à la stimulation de l'expression du gène codant l'asparagine synthétase (*ASNS3*) chez le mutant *sdg8-5* (Li *et al.*, 2015). Cependant, aucun gène relatif à la synthèse de l'enzyme SDG8 n'a été retrouvé par l'approche RNAseq dans nos conditions, ce qui suggère un fonctionnement différent entre le rosier et l'arabette.

**Les miARN.** Le nitrate inhibe le gène codant la protéine SYD qui semble impliquée dans la régulation du développement des plantes et la transition entre les phases de croissance, au travers de la stimulation du miR176. Ce miARN inhibe les facteurs de transcription de la famille des SPL, notamment impliqués dans l'activité méristématique (Wagner and Meyerowitz, 2002; Farrona, 2004, Kwon *et al.*, 2005) et la synthèse d'anthocyanes (Fal, 2014). Bien qu'aucun gène codant des miARN n'ait été retrouvé par l'approche RNAseq et qu'aucune analyse par q-PCR n'ait été menée pour valider la pertinence du gène SYD dans notre étude, il est possible que la régulation du niveau d'accumulation de certains gènes clés du débourrement soit sous la dépendance de miARN.

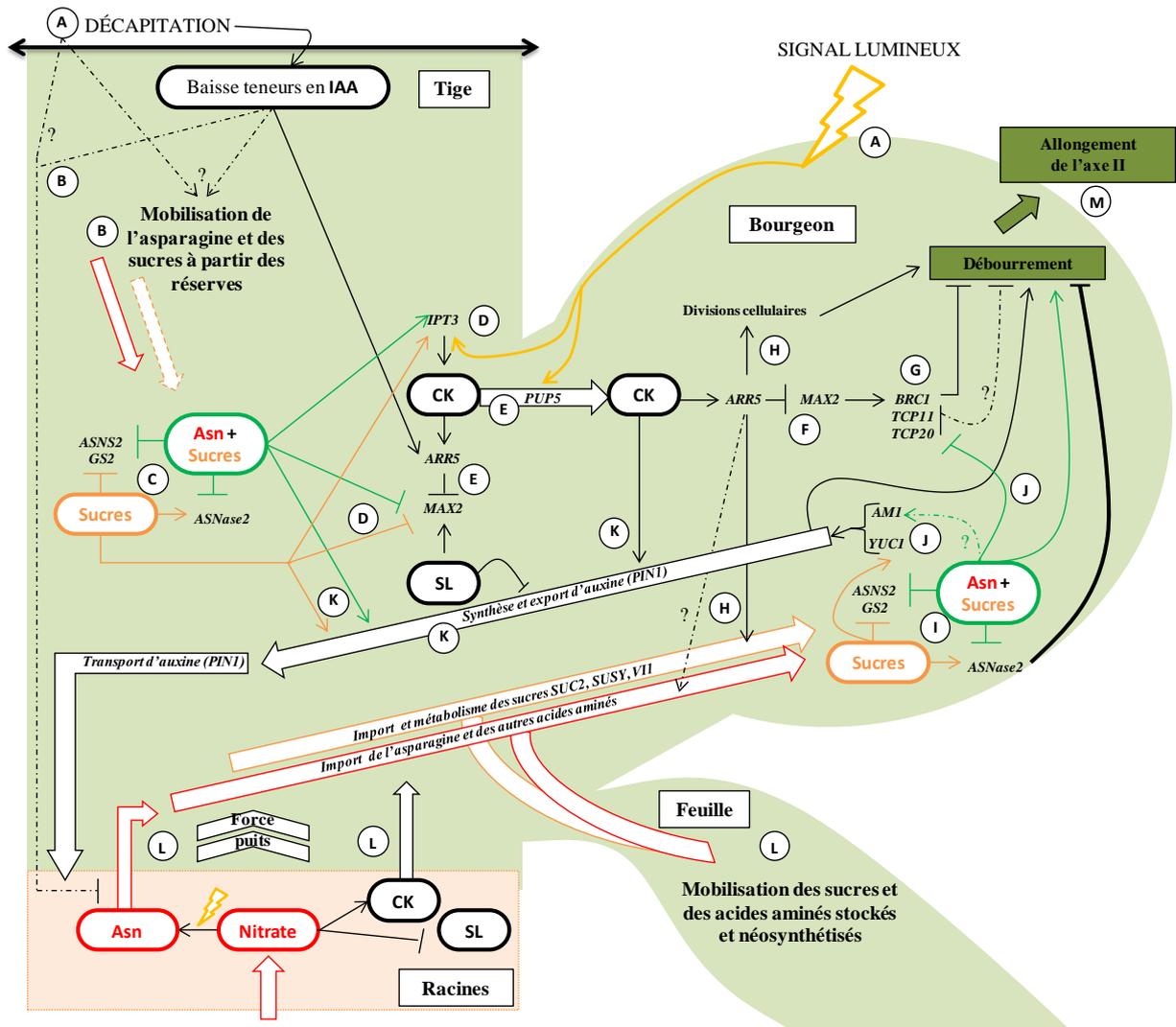


Ainsi, d'après l'ensemble de ces résultats, le métabolisme des marques épigénétiques, tout juste abordé dans ce manuscrit, constitue une piste de recherche importante pour comprendre les évènements moléculaires sous-jacents au débourrement des bourgeons chez le rosier.



# CONCLUSION

MODÈLE INTÉGRATIF DU DÉBOURREMENT ET DE L'ALLONGEMENT  
DE L'AXE QUI EN EST ISSU CHEZ LE ROSIER



« *ASNase2* » Gènes impliqués dans le débournement

→ Transport de sucres (saccharose, glucose, fructose)

→ Transport d'asparagine

→ Transport de régulateurs de croissance

→ Stimulation

—| Inhibition

⋯?⋯ Effets à confirmer

— Effets directs ou indirects dans la condition permissive

— Effets directs ou indirects en présence de sucres

**Azote** Molécules du métabolisme de l'azote (Nitrate, Asn : asparagine)

**Sucres** Saccharose, glucose et/ou fructose

**Asn + Sucres** Condition permissive

**CK** Régulateurs de croissance (SL : strigolactones, CK : cytokinines, IAA : auxine)

NB : - L'épaisseur des flèches n'est pas liée à l'importance des flux et des niveaux d'accumulation des transcrits.

- L'ordre proposé des étapes induisant ou non le débournement est représenté par (A)

**Figure 80 : modèle hypothétique récapitulant les rôles de l'asparagine et des sucres au cours du débournement et la nutrition des axes II, dans la voie de l'auxine, des cytokinines et des strigolactones chez *Rosa hybrida*.**

Légende ci-contre.

Liste des gènes présentés sur le schéma intégratif : *ASNS2* : synthèse d'asparagine, *ASNase2* : hydrolyse de l'asparagine, *GS2* : synthèse de glutamine, *SUC2* : transporteur de saccharose, *SUSY et VII* : hydrolyse du saccharose en glucose et fructose, *IPT3* : synthèse de cytokinines, *ARR5* : signalisation par les cytokinines, *PUP5* : transporteur de cytokinines (Roman *et al.*, 2016), *MAX2* : signalisation par les strigolactones, *AMI* (non-confirmé par q-PCR) et *YUC1* : gènes de synthèse d'auxine appartenant à des voies différentes, *PIN1* : transport d'auxine, *BRC1*, *TCP11* et *TCP20* : facteurs de transcription.

Le modèle présente les effets de deux contextes nutritionnels sur le niveau d'accumulation des transcrits de gènes connus comme étant impliqués dans le débourrement et de ceux obtenus par l'approche RNAseq en réponse au nitrate et étudiés en q-PCR. Les nœuds ont été cultivés *in vitro* pendant 24 heures (J+1) sur un milieu contenant de l'asparagine (à la concentration physiologique dans la sève de plantes dont tous les bourgeons débourrent, 10 mM, en rouge) et en présence de saccharose (100 mM). Cette situation aboutit au débourrement (condition permissive en vert), contrairement à la condition de référence (saccharose seul, en orange). Les résultats de culture *in vitro* ont été extrapolés et intégrés à l'échelle d'une plante réduite à quatre organes (tige, bourgeon, feuille et racines) pour proposer une vue hypothétique de l'origine de l'asparagine au cours des premières phases d'allongements des axes II.

- A- Les premiers signaux perçus par les nœuds cultivés *in vitro* sont la décapitation (réponse moléculaire due à la baisse soudaine des teneurs en auxine et/ou transmission de signaux électriques ou hydrauliques (d'après la review de Vian *et al.*, 2015) et la lumière dont le bourgeon a systématiquement besoin pour débourrer (Girault *et al.*, 2008).
- B- La réponse à la décapitation, à la baisse des teneurs en auxine dans la tige et/ou l'effet blessure induit potentiellement une mobilisation des réserves (sucres et acides aminés) et une diminution du flux d'acides aminés exportés des racines dans le xylème à l'échelle de la plante entière décapitée. En effet, les deux atomes d'azote qui composent la molécule d'asparagine proviennent de la remobilisation.
- C- C'est pourquoi la synthèse de glutamine et d'asparagine n'est pas nécessaire dans la tige dans les premières heures qui suivent la décapitation, quel que soit le contexte nutritionnel. L'hydrolyse de l'asparagine (*ASNase2*) en présence de saccharose pourrait être un premier frein au débourrement dans cette condition, en limitant les teneurs de cet acide aminé ou en orientant son assimilation vers une voie inappropriée.
- D- Les deux contextes nutritionnels permettent la synthèse de cytokinines et l'inhibition de la signalisation par les strigolactones dans la tige.
- E- La synthèse des cytokinines permet à la fois de stimuler leur importation (*PUP5*) dans le bourgeon et la stimulation du gène de signalisation *ARR5* dont le produit d'expression inhibe les strigolactones (*MAX2*, Roman *et al.*, 2016).



- F- Dans nos conditions, le gène *ARR5* est stimulé dans les deux organes sans lien avec la composition du milieu. À nouveau, la signalisation par les cytokinines inhibe celle par les strigolactones dans le bourgeon.
- G- L'absence de signalisation par les strigolactones aboutit à la répression du facteur de transcription *BRC1* et permet, au moins en partie, l'initiation du débourrement. L'implication des gènes *TCP11* (identifié par RNAseq) et *TCP20*, codant des facteurs de transcription de la famille de *BRC1*, reste à prouver, bien que leur niveau d'expression diminuent au cours du débourrement en réponse aux deux contextes nutritionnels.
- H- La signalisation par les cytokinines induit la reprise des divisions cellulaires (organogénèse, Roman *et al.*, 2016), qui nécessitent l'importation d'éléments nutritifs. Le saccharose est hydrolysé en glucose et en fructose (*SUSY, VII*) qui sont importés dans le bourgeon (*SUC2*, Henry *et al.*, 2011; Rabot *et al.*, 2012). Le mode de transport des acides aminés, notamment de l'asparagine, n'est pas renseigné au cours de cette étape. L'effet du produit d'expression du gène *ARR5* sur l'importation d'asparagine reste à prouver.
- I- À nouveau, l'hydrolyse de l'asparagine (*ASNase2*) dans le bourgeon en présence de saccharose est un frein au débourrement dans cette condition. L'importation d'asparagine dans le bourgeon ne nécessite pas sa production à J+1 (*ASNS2* et *GS2* inhibés).
- J- La présence simultanée d'asparagine et de saccharose dans le bourgeon à J+1 n'a pas d'effet marqué sur le niveau d'accumulation des transcrits du gène *YUC1*, tandis qu'il est stimulé en l'absence d'asparagine. En revanche, le gène *AMII*, impliqué dans une voie parallèle de synthèse d'auxine, a été isolé par l'approche RNAseq en réponse au nitrate et pourrait être exprimé en présence d'asparagine.
- K- Quelle que soit la voie de synthèse d'auxine empruntée dans le bourgeon, les deux contextes nutritionnels, ainsi que les cytokinines (Roman *et al.*, 2016), induisent son export vers la tige, et potentiellement vers les bourgeons sous-jacents sur l'axe I et les racines dans le contexte d'une plante entière.
- L- L'exportation d'auxine et la consommation des premières ressources nutritives carbonées et azotées pour alimenter les divisions cellulaires dans le bourgeon induisent une augmentation de la force puits de ce dernier. Lorsque du nitrate est disponible dans les racines, le flux d'acides aminés, notamment d'asparagine, augmente dans la sève. Le métabolisme des régulateurs de croissance dans les racines reste à étudier chez le rosier, et s'appuie donc ici sur les données bibliographiques (Waters *et al.*, 2017). Les organes de toute la plante mobilisent de l'asparagine et des sucres. Ces nouveaux apports permettent d'initier l'allongement des axes II à J+1.
- M- À J+7, les gènes codant les trois facteurs de transcription (*BRC1*, *TCP20* et *TCP11*) sont inhibés dans les axes II en allongement, alors qu'ils sont stimulés en présence de saccharose (frein à l'allongement). Le gène *IPT3* est toujours actif dans la tige dans la condition



permissive, alors qu'il est inhibé en présence de saccharose (frein à l'allongement). La part de l'absorption courante dans l'alimentation en azote de l'axe II est importante. Ces axes commencent à produire et assimiler eux-mêmes une partie des acides aminés (expression des gènes *ASNS2*, *GS2* et *ASNase2*). Les teneurs en sucres dans les feuilles ont augmenté et alimentent probablement les axes II. L'exportation d'auxine a augmenté par rapport à J+1 (*PIN1*). Ces différents aspects permettent de soutenir la croissance de l'axe II issu du débourrement des bourgeons.



# PERSPECTIVES



## **I° Perspective principale : étudier le devenir de l'asparagine au cours de l'allongement des axes II**

Au vu de l'ensemble des résultats, la principale perspective de ce travail repose sur l'approfondissement des aspects nutritionnels de l'alimentation en azote des axes II en croissance après le débourrement. L'asparagine peut être désormais considérée comme un acteur nutritionnel majeur au cours de ce phénomène chez le rosier, ce qui explique que la croissance des axes II est améliorée après un apport d'asparagine sur le feuillage chez le peuplier et sur le sol chez l'olivier (Cline *et al.*, 2006, Proietti & Tombesi, 1996). Cependant, plusieurs points importants doivent être précisés :

- **déterminer les voies métaboliques alimentées par l'asparagine.** C'est l'acide aminé dont la teneur est la plus forte dans les tissus à J+7, notamment dans les axes II. À J+14 en revanche, la teneur en asparagine libre dans l'ensemble des tissus ayant fortement diminuée, il est probable que cette molécule ait été utilisée pour soutenir l'allongement. L'utilisation d'asparagine marquée sur différents atomes ( $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$ ) permettrait de suivre le devenir des atomes de cet acide aminé et donc de déterminer les voies métaboliques alimentées prioritairement lors du débourrement, ainsi que leur niveau relatif de consommation d'asparagine. En particulier, il serait intéressant de connaître la proportion d'asparagine retrouvée dans la fraction protéique (enzymes, protéines de stockage, protéines structurales) et celle métabolisée dans différentes voies (cycle de Krebs, cycle de l'urée, photorespiration). Le catabolisme de l'asparagine est simple par rapport à ceux des autres acides aminés, principalement au travers de transaminations (Hildebrandt *et al.*, 2015) et il est envisageable que les fonctions amide et amine qui composent la molécule d'asparagine ne soient pas dirigées vers les mêmes voies (Ta *et al.*, 1984). Cela amènerait des informations importantes pour comprendre l'implication préférentielle de l'asparagine par rapport aux autres acides aminés (glutamine et aspartate en particulier). L'utilisation d'une molécule d'asparagine marquée sur différents atomes dans plusieurs conditions de nutrition devrait permettre de comprendre comment les plantes adaptent leur métabolisme conduisant à l'établissement de différents phénotypes.

- **comprendre l'interaction nutritionnelle entre le saccharose et l'asparagine.** La connaissance des voies métaboliques alimentées par l'asparagine permettrait de progresser dans la compréhension de la nécessité d'amener simultanément l'asparagine et le saccharose pour permettre le débourrement du bourgeon et l'allongement de l'axe II. Le respect d'un



rapport C/N particulier (sucre/asparagine et sucre/glutamine) pourrait être une variable importante. Plusieurs résultats le laissent supposer. i) La présence simultanée de saccharose et d'un acide aminé riche en azote (glutamine et asparagine à leur concentration physiologique, deux atomes d'azote par molécule) est nécessaire pour permettre l'allongement des axes II après la levée de dominance apicale. ii) Les répartitions acropètes à J+0 en traitement N12 des teneurs en sucres simples et en asparagine sont en adéquation avec le gradient acrotone d'allongement. La glutamine est quant à elle bien moins abondante que l'asparagine dans les tissus, ce qui amoindrit son rôle dans l'alimentation en azote des axes II. Il serait intéressant de cultiver des nœuds *in vitro* sur un milieu propice à un allongement efficace des axes II pendant 3 à 4 jours, puis de transférer les explants sur un milieu dont le rapport C/N est différent afin d'en étudier l'effet sur l'allongement, et d'intégrer ainsi une dimension nutritionnelle solidement établie.

- **déterminer la quantité de nutriments (carbone et azote) nécessaire pour soutenir la croissance d'un axe II pendant un temps donné.** Des expériences menées *in vitro* sur des bourgeons isolés permettraient d'évaluer ces grandeurs grâce à l'utilisation de molécules marquées (<sup>13</sup>C et <sup>15</sup>N). Pour intégrer ces résultats à l'échelle de la plante entière, des expériences devront également être menées *in vivo*, le long de l'axe I, sur lequel on ne laisserait subsister qu'un seul bourgeon. Il faudrait alors associer des mesures de flux d'asparagine dans la sève au voisinage de ce bourgeon à des dosages de la teneur en azote total dans l'axe II issu du débourrement du seul bourgeon persistant. Cela suppose d'étudier plus en détails i) le **métabolisme des racines**, dont la concentration et le débit d'acides aminés varient au moins en partie en réponse à la suppression de l'apex (baisse de l'auxine) et à la force puits des bourgeons (J+1 et J+4, respectivement, Figure 33), ainsi qu'en fonction du rythme circadien. Un dosage des teneurs en régulateurs de croissance dans les racines et des mesures de flux de la sève chez des plantes décapitées dont l'extrémité de la tige est recouverte d'une goutte de lanoline contenant de l'auxine, permettraient de mieux comprendre le rôle de l'auxine dans la régulation du flux d'acides aminés à la sortie des racines. ii) Les résultats présentés dans ce manuscrit démontrent également l'implication de la **remobilisation de l'azote sous forme d'asparagine** dans la nutrition des axes II dans les premières phases de leur allongement. Au-delà de la quantification dans les axes II de l'asparagine ayant une origine différente de l'assimilation courante, il serait intéressant de déterminer si ce sont principalement des protéines qui sont dégradées pour libérer l'asparagine (et d'identifier leur identité) ou si elle provient de l'assimilation du nitrate ou d'autres acides aminés présents



dans les différents organes avant la décapitation. Pour étudier cette seconde hypothèse, nous prévoyons de doser l'activité de la glutamine synthétase dans les tissus le long de l'axe I dans le cadre du traitement N12. Cependant, ces expériences pourraient être menées en faisant varier le rapport C/N : il serait en effet pertinent de mesurer le flux d'asparagine dans la sève au cours de variations de l'intensité lumineuse, de la teneur atmosphérique en dioxyde de carbone, de la disponibilité en azote au sens large dans la solution nutritive au niveau des racines ou du feuillage (aspersion). Cela devrait permettre de comprendre comment les plantes adaptent leurs métabolismes carbonés et azotés pour modifier leur architecture.

## **II° Seconde perspective : déterminer si des évènements de signalisation surviennent en réponse à l'azote au cours du débourrement**

**Identifier l'existence d'un signal en réponse à l'azote au cours du débourrement et l'identité de la molécule.** Au-delà de la fonction de nutrition de l'asparagine mis en évidence par ces travaux, nous avons démontré que la présence simultanée de sucre et de sources d'azote précises (nitrate, glutamine, asparagine et GABA) est nécessaire à l'allongement des axes II. Les données sans *a priori* de RNAseq et les résultats de q-PCR suggèrent l'existence de gènes dont l'expression pourrait être régulée par l'azote au sens large au cours du débourrement. Par analogie avec le double rôle des sucres, certains de ces acteurs du métabolisme de l'azote identifiés comme étant impliqués dans l'allongement pourraient agir comme une molécule-signal après la levée de dominance apicale. Au vu de nos résultats expérimentaux, différents scénarii peuvent être proposés.

- Il est envisageable que l'un des précurseurs de l'asparagine soit un métabolite-signal, l'asparagine produite en aval n'aurait alors qu'un rôle de nutrition. Plusieurs études de transcriptomique ont démontré la capacité du nitrate à stimuler de nombreux gènes dans divers contextes biologiques, tels que ceux liés à la production des cytokinines et au métabolisme de l'azote (Crawford, 1995; Meyer and Stitt, 2001; Forde, 2002a; Takei *et al.*, 2002a). D'après cette hypothèse, le nitrate absorbé et rendu non-assimilable par la présence de tungstate dans la solution nutritive aurait été à l'origine du débourrement du bourgeon du sommet de l'axe I décapité (traitement N12+W, Figure 31). La totalité des molécules de glutamine contient au moins un atome d'azote issu de l'assimilation du nitrate dans les nœuds cultivés *in vitro* à J+1 et 50% d'entre elles ont les deux atomes marqués au <sup>15</sup>N. Ainsi, à l'échelle de la plante entière, la glutamine pourrait être un métabolite-signal qui intégrerait la disponibilité en azote à la fois dans l'environnement racinaire et dans les tissus avant le



débourrement. Aucune étude du niveau de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des régulateurs de croissance n'a pour l'heure été réalisée en présence de nitrate ou de glutamine à leur concentration physiologique.

- À l'échelle du nœud cultivé *in vitro*, l'asparagine est l'acide aminé prédominant dans la tige à J+1 et provient en totalité de la mobilisation des réserves internes aux tissus, et le niveau d'accumulation des transcrits du gène codant l'asparagine synthétase est fortement réprimé en présence de saccharose dans la tige et le bourgeon (Figure 55, Annexe XVII). Cela suggère que l'asparagine libre présente dans les tissus à J+1 provient plutôt de la protéolyse que de l'assimilation du nitrate stocké dans les vacuoles avant la décapitation ou présent dans le milieu de culture. **La mobilisation de l'asparagine au voisinage des tissus pourrait être plus rapide que l'éventuelle perception d'un signal de nature moléculaire en provenance des racines.** L'asparagine issue de la mobilisation des réserves étant la molécule riche en azote prédominante dans la tige au moment de la modification des balances hormonales après la décapitation, c'est une candidate de choix pour stimuler de manière précoce les gènes sous la dépendance de l'azote au cours du débourrement et ceux impliqués dans le statut des régulateurs de croissance comme il a été démontré par q-PCR.

Pour déterminer si l'asparagine est un métabolite signal, il faudrait mettre en évidence par des q-PCR à des temps courts après la levée de dominance apicale qu'elle stimule des gènes impliqués dans le débourrement lorsqu'elle est apportée à une faible concentration au voisinage des bourgeons. De même, une variation du niveau d'accumulation des transcrits de gènes impliqués dans le débourrement en réponse à la concentration physiologique d'asparagine en présence d'un régulateur de croissance inhibant le débourrement (auxine, strigolactones) pourrait signifier que cet acide aminé est un métabolite-signal. Dans tous les cas, l'utilisation d'un analogue structural de l'asparagine constitue une stratégie intéressante pour mimer les effets de l'asparagine en tant que signal, sans apporter la composante nutritionnelle. Dans ce cadre, nous venons de débiter des échanges avec un laboratoire tchèque (Laboratory of Growth Regulators, Institute of Experimental Botany, AS CR & Palacky, University, Olomouc, Czech Republic) pour mettre au point un analogue structural de l'asparagine, proche par exemple de l'acide D-Pyroglutamique (5-hydroxy-2-pyrrolidone-5-carboxylate, (Stephani and Meister, 1971) ou du 5-Diazo-4-oxo-L-norvaline (Handschumacher *et al.*, 1968), qui ont été caractérisés chez les animaux. Ce rôle de signalisation doit être exclusif à l'asparagine, son effet ne devant pas être retrouvé en réponse aux autres molécules azotées en amont de sa biosynthèse et qui sont connus pour être des



métabolites de signalisation dans d'autres contextes physiologiques, tels que le nitrate (Crawford, 1995), le glutamate (Forde, 2014; Weiland *et al.*, 2015) et la glutamine (Liu *et al.*, 2017). En revanche, le GABA issu du shunt du glutamate en l'absence d'asparagine, pourrait également appartenir à une voie de signalisation en réponse à une faible disponibilité en nitrate.

**Établir le positionnement de l'éventuel signal azoté par rapport au signal lumineux.**

Au-delà des considérations relatives à la nature du signal azoté, il est important de noter que l'éventuelle fonction de signalisation par l'azote interviendrait en aval de la perception du signal lumineux. En effet, les bourgeons de rosier cultivés en présence de saccharose et d'une concentration non-physiologique de nitrate (10 mM) ou d'une concentration physiologique d'asparagine (10 mM), ne sont pas capables de produire un axe II à l'obscurité, même si le débourrement a été initié à la lumière pendant la journée de photopériode classique (traitement LO, Figure 69) juste après la mise en culture *in vitro* du matériel végétal. Cela suggère que l'asparagine ne permet pas de lever le besoin de lumière pour initier le débourrement du bourgeon et que ses effets nutritionnels (et peut-être de signalisation) surviennent en aval de la réponse à la perception du signal lumineux, mais des analyses par q-PCR permettraient d'étudier cette hypothèse.

**Établir l'implication d'une composante épigénétique dans la mise en place du gradient de débourrement le long de l'axe I.** Nous avons démontré que le niveau global de méthylation de l'ADN des bourgeons est identique avant la levée de dominance apicale entre la base et le sommet de l'axe I. En revanche, il est possible qu'il y ait un gradient de méthylation de l'ADN et/ou de méthylation/acétylation des histones dans la tige (coussinet) qui conditionnerait les bourgeons à être plus ou moins sensibles aux variations des teneurs en régulateurs de croissance et en nutriments à leur voisinage. Le débourrement des bourgeons pourrait en effet être sous la dépendance d'une identité de position le long de l'axe I, de nature épigénétique, qui serait intrinsèque aux tissus. Si tel est le cas, un état de dormance plus profond imposé par des marques épigénétiques inhibitrices limiterait le débourrement des bourgeons de la base de l'axe I, ou l'allongement des axes II qui en sont issus, dans le cadre d'une carence en nitrate dans la solution nutritive.



# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Adhikari E, Lee D-K, Giavalisco P, Sieburth LE.** 2013. Long-distance signaling in *bypass1* mutants: bioassay development reveals the *bps* signal to be a metabolite. *Molecular plant* **6**, 164–173.
- Aguilar-Martinez JA, Poza-Carrion C, Cubas P.** 2007. *Arabidopsis* *BRANCHED1* acts as an integrator of branching signals within axillary buds. *The Plant Cell Online* **19**, 458–472.
- Akagi T, Yin D, Kawamata N, Bartram CR, Hofmann WK, Wolf I, Miller CW, Koeffler HP.** 2006. Methylation analysis of asparagine synthetase gene in acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia* **20**, 1303–1303.
- Alves G, Decourteix M, Fleurat-Lessard P, Sakr S, Bonhomme M, Améglio T, Lacoite A, Julien J-L, Petel G, Guilliot A.** 2007. Spatial activity and expression of plasma membrane H<sup>+</sup>/ATPase in stem xylem of walnut during dormancy and growth resumption. *Tree Physiology* **27**, 1471–1480.
- Anderson JV, Gesch RW, Jia Y, Chao WS, Horvath DP.** 2005. Seasonal shifts in dormancy status, carbohydrate metabolism, and related gene expression in crown buds of leafy spurge. *Plant, Cell & Environment* **28**, 1567–1578.
- Anuradha S, Rao SSR.** 2003. Application of brassinosteroids to rice seeds (*Oryza sativa* L.) reduced the impact of salt stress on growth, prevented photosynthetic pigment loss and increased nitrate reductase activity. *Plant Growth Regulation* **40**, 29–32.
- Argyros RD, Mathews DE, Chiang Y-H, Palmer CM, Thibault DM, Etheridge N, Argyros DA, Mason MG, Kieber JJ, Schaller GE.** 2008. Type B response regulators of *Arabidopsis* play key roles in cytokinin signaling and plant development. *The Plant Cell Online* **20**, 2102–2116.
- Ariz I, Asensio AC, Zamarreño AM, García-Mina JM, Aparicio-Tejo PM, Moran JF.** 2013. Changes in the C/N balance caused by increasing external ammonium concentrations are driven by carbon and energy availabilities during ammonium nutrition in pea plants: the key roles of asparagine synthetase and anaplerotic enzymes. *Physiologia Plantarum* **148**, 522–537.
- Avice JC, Ourry A, Lemaire G, Boucaud J.** 1996. Nitrogen and carbon flows estimated by <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C pulse-chase labeling during regrowth of alfalfa. *Plant Physiology* **112**, 281–290.
- Azcón-Bieto J.** 1983. Inhibition of photosynthesis by carbohydrates in wheat leaves. *Plant Physiology* **73**, 681–686.
- Azpiroz R, Wu Y, LoCascio JC, Feldmann KA.** 1998. An *Arabidopsis* brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation. *The Plant Cell* **10**, 219–230.
- Azri W, Le Gourrierc J, Demotes-Mainard S, Huché-Thélier L, Rabot A, Guérin V, Sakr S.** 2015. Impacts of contrasting light on bud burst and on *RwMAX1* and *RwMAX2* expression in rose. *Acta Physiologiae Plantarum* **37**, 1–9.
- Barbier F, Lunn JE, Beveridge CA.** 2015a. Ready, steady, go! A sugar hit starts the race to shoot branching. *Current Opinion in Plant Biology* **25**, 39–45.

- Barbier F, Peron T, Lecerf M, Perez-Garcia MD, Barriere Q, Rolik J, Boutet-Mercey S, Citerne S, Lemoine R, Porcheron B, Roman H, Leduc N, Le Gourrierec J, Bertheloot J, Sakr S.** 2015*b*. Sucrose is an early modulator of the key hormonal mechanisms controlling bud outgrowth in *Rosa hybrida*. *Journal of Experimental Botany* **66**, 2569–2582.
- Berg A, Meza TJ, Mahić M, Thorstensen T, Kristiansen K, Aalen RB.** 2003. Ten members of the *Arabidopsis* gene family encoding methyl-CpG-binding domain proteins are transcriptionally active and at least one, *AtMBD11*, is crucial for normal development. *Nucleic Acids Research* **31**, 5291–5304.
- Beveridge CA.** 2000. Long-distance signalling and a mutational analysis of branching in pea. *Plant Growth Regulation* **32**, 193–203.
- Bobille H, Limami AM, Robins RJ, Cukier C, Le Floch G, Fustec J.** 2016. Evolution of the amino acid fingerprint in the unsterilized rhizosphere of a legume in relation to plant maturity. *Soil Biology and Biochemistry* **101**, 226–236.
- Bollard.** 1957. Nitrogenous compounds in tracheal sap of woody members of the family *Rosaceae*. *Australian Journal of Biological Sciences* **10**, 288–291.
- Bonhomme M, Peuch M, Ameglio T, Rageau R, Guillot A, Decourteix M, Alves G, Sakr S, Lacoïnte A.** 2009. Carbohydrate uptake from xylem vessels and its distribution among stem tissues and buds in walnut (*Juglans regia L.*). *Tree Physiology* **30**, 89–102.
- Bouché N, Fromm H.** 2004. GABA in plants: just a metabolite? *Trends in Plant Science* **9**, 110–115.
- Boumaza R, Demotes-Mainard S, Huché-Thelie L, Guérin V.** 2009. Visual characterization of the esthetic quality of the rosebush. *Journal of Sensory Studies* **24**, 774–796.
- Braun N, de Saint Germain A, Pillot J-P, Boutet-Mercey S, Dalmais M, Antoniadi I, Li X, Maia-Grondard A, Le Signor C, Bouteiller N, Luo D, Bendahmane A, Turnbull C, Rameau C.** 2012. The pea TCP transcription factor *PsBRCL1* acts downstream of strigolactones to control shoot branching. *Plant Physiology* **158**, 225–238.
- Breitkreuz KE, Shelp BJ, Fischer WN, Schwacke R, Rentsch D.** 1999. Identification and characterization of GABA, proline and quaternary ammonium compound transporters from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters* **450**, 280–284.
- Brewer PB, Dun EA, Ferguson BJ, Rameau C, Beveridge CA.** 2009. Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **150**, 482–493.
- Brown JCL, De Decker MM, Fieldes MA.** 2008. A comparative analysis of developmental profiles for DNA methylation in 5-azacytidine-induced early-flowering flax lines. *Plant Science* **175**, 217–225.
- Büttner M.** 2007. The monosaccharide transporter (-like) gene family in *Arabidopsis*. *Febs Letters* **581**, 2318–2324.

- Carneros E, Yakovlev I, Viejo M, Olsen JE, Fossdal CG.** 2017. The epigenetic memory of temperature during embryogenesis modifies the expression of bud burst-related genes in Norway spruce epitypes. *Planta* **246**, 553–566.
- Causevic A, Delaunay A, Ounnar S, Righezza M, Delmotte F, Brignolas F, Hagège D, Maury S.** 2005. DNA methylating and demethylating treatments modify phenotype and cell wall differentiation state in sugarbeet cell lines. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**, 681–691.
- Causin HF, Barneix AJ.** 1994. The effect of glutamine and asparagine on net  $\text{NH}_4^+$  uptake in young wheat plants. *Plant and soil* **161**, 257–265.
- Cazzonelli CI, Cuttriss AJ, Cossetto SB, Pye W, Crisp P, Whelan J, Finnegan J, Turnbull C, Pogsona BJ.** 2009a. Regulation of carotenoid composition and shoot branching in *Arabidopsis* by a chromatin modifying histone methyltransferase, SDG8. *The Plant Cell* **21**, 29–53.
- Cazzonelli CI, Nisar N, Roberts AC, Murray KD, Borevitz JO, Pogson BL.** 2014. A chromatin modifying enzyme, *SDG8*, is involved in morphological, gene expression, and epigenetic responses to mechanical stimulation. *Frontiers in Plant Science* **5**, 1–10.
- Cazzonelli CI, Yin K, Pogson BJ.** 2009b. Potential implications for epigenetic regulation of carotenoid biosynthesis during root and shoot development. *Plant Signaling and Behavior* **4**, 339–341.
- Chao WS, Dođramacı M, Horvath DP, Foley ME, Anderson JV.** 2015. Dormancy Induction and Release in Buds and Seeds. In: *Advances in Plant Dormancy*, ed Anderson JV, Springer International Publishing, Cham, 235–256.
- Chao WS, Foley ME, Horvath DP, Anderson JV.** 2007. Signals regulating dormancy in vegetative buds. *International Journal of Plant Developmental Biology* **1**, 49–56.
- Chao WS, Serpe MD, Anderson JV, Gesch RW, Horvath DP.** 2006. Sugars, hormones, and environment affect the dormancy status in underground adventitious buds of leafy spurge (*Euphorbia esula*). *Weed Science* **54**, 59–68.
- Chardin C, Girin T, Roudier F, Meyer C, Krapp A.** 2014. The plant RWP-RK transcription factors: key regulators of nitrogen responses and of gametophyte development. *Journal of Experimental Botany* **65**, 5577–5587.
- Chary SN, Hicks GR, Choi YG, Carter D, Raikhel NV.** 2007. Trehalose-6-Phosphate Synthase/Phosphatase Regulates Cell Shape and Plant Architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **146**, 97–107.
- Chen LQ, Cheung LS, Feng S, Tanner W, Frommer WB.** 2015. Transport of sugars. *Annual Review of Biochemistry* **84**, 865–894.
- Chen LQ, Hou B-H, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu XQ, Guo WJ, Kim JG, Underwood W, Chaudhuri B, Chermak D, Antony G, White FF, Somerville SC,**

- Mudgett MB, Frommer WB.** 2010. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**, 527–532
- Chen LQ, Qu X-Q, Hou B-H, Sosso D, Osorio S, Fernie AR, Frommer WB.** 2012. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* **335**, 207–211.
- Chen Q, Chen X, Wang Q, Zhang F, Lou Z, Zhang Q, Zhou D-X.** 2013a. Structural basis of a histone H3 lysine 4 demethylase required for stem elongation in rice. *PLoS Genetics* **9**, 1–11.
- Chen X, Hu Y, Zhou D-X.** 2011. Epigenetic gene regulation by plant Jumonji group of histone demethylase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1809**, 421–426.
- Chen X, Zhou X, Xi L, Li J, Zhao R, Ma N, Zhao L.** 2013b. Roles of *DgBRC1* in regulation of lateral branching in *Chrysanthemum ×grandiflora* cv. *Jinba*. *PLoS ONE* **8**. 1–11.
- Chen Z-H, Walker RP, Técsi LI, Lea PJ, Leegood RC.** 2004. Phosphoenolpyruvate carboxykinase in cucumber plants is increased both by ammonium and by acidification, and is present in the phloem. *Planta* **219**, 48–58.
- Cheng C, Acedo GN, Cristinsin M, Conkling MA.** 1992. Sucrose mimics the light induction of *Arabidopsis* nitrate reductase gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 1861–1864.
- Cherbuy B, Joffre R, Gillon D, Rambal S.** 2001. Internal remobilization of carbohydrates, lipids, nitrogen and phosphorus in the Mediterranean evergreen oak *Quercus ilex*. *Tree Physiology* **21**, 9–17.
- Chevalier C, Bourgeois E, Just D, Raymond P.** 1996. Metabolic regulation of asparagine synthetase gene expression in maize (*Zea mays* L.) root tips. *The Plant Journal* **9**, 1–11.
- Choubane D, Rabot A, Mortreau E, Legourrierc J, Péron T, Foucher F, Ahcène Y, Pelleschi-Travier S, Leduc N, Hamama L, Sakr S.** 2012. Photocontrol of bud burst involves gibberellin biosynthesis in *Rosa* sp. *Journal of Plant Physiology* **169**, 1271–1280.
- Cline MG.** 1994. The role of hormones in apical dominance. New approaches to an old problem in plant development. *Physiologia Plantarum* **90**, 230–237.
- Cline MG.** 1996. Exogenous auxin effects on lateral bud outgrowth in decapitated shoots. *Annals of Botany* **78**, 255–266.
- Cline M.** 1997. Concepts and terminology of apical dominance. *American journal of botany* **84**, 1064–1064.
- Cline MG, Thangavelu M, Dong-II K.** 2006. A possible role of cytokinin in mediating long-distance nitrogen signaling in the promotion of sylleptic branching in hybrid poplar. *Journal of Plant Physiology* **163**, 684–688.

- Cliquet J-B, Deléens E, Bousser A, Martin M, Lescure J-C, Prioul J-L, Mariotti A, Morot-Gaudry J-F.** 1990a. Estimation of carbon and nitrogen allocation during stalk elongation by  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  tracing in *Zea mays* L. *Plant Physiology* **92**, 79–87.
- Cliquet J-B, Deléens E, Mariotti A.** 1990b. C and N mobilization from stalk and leaves during kernel filling by  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  tracing in *Zea mays* L. *Plant Physiology* **94**, 1547–1553.
- Cokus SJ, Feng S, Zhang X, Chen Z, Merriman B, Haudenschild CD, Pradhan S, Nelson SF, Pellegrini M, Jacobsen SE.** 2008. Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* **452**, 215–219.
- Cooke JEK, Eriksson ME, Junttila O.** 2012. The dynamic nature of bud dormancy in trees: environmental control and molecular mechanisms: bud dormancy in trees. *Plant, Cell & Environment* **35**, 1707–1728.
- 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 Cell Physiology* **43**, 684–688.
- Corbesier L, Havelange A, Lejeune P, Bernier G, Périlleux C.** 2001. N content of phloem and xylem exudates during the transition to flowering in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* **24**, 367–375.
- Corpas FJ, Chaki M, Fernandez-Ocana A, Valderrama R, Palma JM, Carreras A, Begara-Morales JC, Airaki M, del Rio LA, Barroso JB.** 2008. Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant and Cell Physiology* **49**, 1711–1722.
- Cosgrove DJ.** 1997. Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *The Plant Cell* **9**, 1031–1041.
- Costes E, Crespel L, Denoyes B, Morel P, Demene M-N, Lauri P-E, Wenden B.** 2014. Bud structure, position and fate generate various branching patterns along shoots of closely related *Rosaceae* species: a review. *Frontiers in Plant Science* **5**, 1–11.
- Cottignies A.** 1985. Dormance et croissance active du frêne (*Fraxinus excelsior* L.).
- Crawford NM.** 1995. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *The Plant Cell* **7**, 859–868.
- Crespel L, Le Bras C, Relion D, Roman H, Morel P.** 2015. Effect of high temperature on the production of 2n pollen grains in diploid roses and obtaining tetraploids via unilateral polyploidization. *Plant Breeding* **134**, 356–364.
- Crespel L, Sigogne M, Donès N, Relion D, Morel P.** 2013. Identification of relevant morphological, topological and geometrical variables to characterize the architecture of rose bushes in relation to plant shape. *Euphytica* **191**, 129–140.
- Criado MV, Caputo C, Roberts IN, Castro MA, Barneix AJ.** 2009. Cytokinin-induced changes of nitrogen remobilization and chloroplast ultrastructure in wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Plant Physiology* **166**, 1775–1785.

- Cunningham SM, Volenec JJ.** 1995. Purification and characterization of vegetative storage proteins from alfalfa (*Medicago sativa L.*) taproots. *Journal of Plant Physiology* **147**, 625–632.
- Curaba J, Talbot M, Li Z, Helliwell C.** 2013. Over-expression of *microRNA171* affects phase transitions and floral meristem determinancy in barley. *BMC Plant Biology* **13**, 1–10.
- Dambrine E, Martin F, Carisey N, Granier A, Hällgren JE, Bishop K.** 1995. Xylem sap composition: A tool for investigating mineral uptake and cycling in adult spruce. *Plant and Soil* **168**, 233–241.
- Dean J-V, Harper J-E.** 1988. The conversion of nitrite to nitrogen oxide(s) by the constitutive NAD(P)H-nitrate reductase enzyme from soybean. *Plant Physiology* **88**, 389–395.
- Debener T, Linde M.** 2009. Exploring complex ornamental genomes: the rose as a model plant. *Critical reviews in plant sciences* **28**, 267–280.
- Decourteix M, Alves G, Bonhomme M, Peuch M, Baaziz KB, Brunel N, Guilliot A, Rageau R, Améglio T, Pétel G.** 2008. Sucrose (JrSUT1) and hexose (JrHT1 and JrHT2) transporters in walnut xylem parenchyma cells: their potential role in early events of growth resumption. *Tree Physiology* **28**, 215–224.
- Déleens E, Gregory N, Bourdu R.** 1984. Transition between seed reserve use and photosynthetic supply during development of maize seedlings. *Plant Science Letters* **37**, 35–39.
- Delgado-Alvarado A, Walker RP, Leegood RC.** 2007. Phosphoenolpyruvate carboxykinase in developing pea seeds is associated with tissues involved in solute transport and is nitrogen-responsive. *Plant, Cell & Environment* **30**, 225–235.
- Demotes-Mainard S, Huché-Thélier L, Morel P, Boumaza R, Guérin V, Sakr S.** 2013. Temporary water restriction or light intensity limitation promotes branching in rose bush. *Scientia Horticulturae* **150**, 432–440.
- Deng M, Moureaux T, Caboche M.** 1989. Tungstate, a molybdate analog inactivating nitrate reductase, deregulates the expression of the nitrate reductase structural gene. *Plant Physiology* **91**, 304–309.
- Dhont C.** 2005. Nitrogen reserves, spring regrowth and winter survival of field-grown Alfalfa (*Medicago sativa*) defoliated in the autumn. *Annals of Botany* **97**, 109–120.
- Dhont C, Bertrand A, Castonguay Y, Cooke JEK, Isabel N.** 2012. Tree size affects accumulation of carbon and nitrogen metabolites in white spruce seedlings during short day-induced bud formation. *Botany* **90**, 941–953.
- Ding Y, Li Z, Broome JD.** 2005. Epigenetic changes in the repression and induction of asparagine synthetase in human leukemic cell lines. *Leukemia* **19**, 420–426.

- Ding C, You J, Chen L, Wang S, Ding Y.** 2014. Nitrogen fertilizer increases spikelet number per panicle by enhancing cytokinin synthesis in rice. *Plant cell reports* **33**, 363–371.
- Dittami SM, Gravot A, Renault D, Goulitquer S, Eggert A, Bouchereau A, Boyen C, Tonon T.** 2011. Integrative analysis of metabolite and transcript abundance during the short-term response to saline and oxidative stress in the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: Abiotic stress response in *Ectocarpus siliculosus*. *Plant, Cell & Environment* **34**, 629–642.
- Djennane S, Hibrand-Saint Oyant L, Kawamura K, Lalanne D, Laffaire M, Thouroude T, Chalain S, Sakr S, Boumaza R, Foucher F, Leduc N.** 2014. Impacts of light and temperature on shoot branching gradient and expression of strigolactone synthesis and signalling genes in rose. *Plant, Cell & Environment* **37**, 742–757.
- Domagalska MA, Leyser O.** 2011. Signal integration in the control of shoot branching. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**, 211–221.
- Dong G, Ma D-P, Li J.** 2008. The histone methyltransferase SDG8 regulates shoot branching in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **373**, 659–664.
- Dong S, Scagel CF, Cheng L, Fuchigami LH, Rygielwicz PT.** 2001. Soil temperature and plant growth stage influence nitrogen uptake and amino acid concentration of apple during early spring growth. *Tree Physiology* **21**, 541–547.
- Drummond RSM, Janssen BJ, Luo Z, Oplaat C, Ledger SE, Wohlers MW, Snowden KC.** 2015. Environmental Control of Branching in Petunia. *Plant Physiology* **168**, 735–751.
- Dubois A, Carrere S, Raymond O, Pouvreau B, Cottret L, Rocchia A, Onesto JP, Sakr S, Atanassova R, Baudino S.** 2012. Transcriptome database resource and gene expression atlas for the rose. *BMC genomics* **13**, 638–649.
- Dun EA, de Saint Germain A, Rameau C, Beveridge CA.** 2012. Antagonistic action of strigolactone and cytokinin in bud outgrowth control. *Plant Physiology* **158**, 487–498.
- Edelin C.** 1984. L'architecture monopodiale : l'exemple de quelques arbres d'Asie tropicale. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 258.
- El Atba N.** 2013. Détection de l'expression des gènes responsables de la biosynthèse des cytokinines en fonction de la nutrition azotée chez le rosier buisson (*Rosa hybrida L.*). Université d'Angers. 36.
- El Zein R, Breda N, Gerant D, Zeller B, Maillard P.** 2011. Nitrogen sources for current-year shoot growth in 50-year-old sessile oak trees: an *in situ* <sup>15</sup>N labeling approach. *Tree Physiology* **31**, 1390–1400.
- Emarat-Pardaz J, Shakiba MR, Toorchi M, Mohammadinasab AD.** 2013. The influence of light intensities and nitrogen on growth of *Hypericum perforatum L.* *International Journal of Agriculture* **3**, 775–781.

- Eom J-S, Chen L-Q, Sosso D, Julius BT, Lin I, Qu X-Q, Braun DM, Frommer WB.** 2015. SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Current Opinion in Plant Biology* **25**, 53–62.
- Evers JB.** 2015. Sugar as a key component of the shoot branching regulation network. *Plant, Cell & Environment* **38**, 1455–1456.
- Fal K.** 2014. SPLAYED: a chromatin remodeler regulating tissue specific gene silencing and developmental timing. Université de Basel. 157.
- Famiani F, Farinelli D, Moscatello S, Battistelli A, Leegood RC, Walker RP.** 2016. The contribution of stored malate and citrate to the substrate requirements of metabolism of ripening peach (*Prunus persica* L. Batsch) flesh is negligible. Implications for the occurrence of phosphoenolpyruvate carboxykinase and gluconeogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry* **101**, 33–42.
- Farrona S.** 2004. The *Arabidopsis thaliana* SNF2 homolog *AtBRM* controls shoot development and flowering. *Development* **131**, 4965–4975.
- Faye L, Johnson KD, Sturm A, Chrispeels MJ.** 1989. Structure, biosynthesis, and function of asparagine-linked glycans on plant glycoproteins. *Physiologia Plantarum* **75**, 309–314.
- Ferguson BJ, Beveridge CA.** 2009. Roles for auxin, cytokinin, and strigolactone in regulating shoot branching. *Plant Physiology* **149**, 1929–1944.
- Fernandez-Marcos M, Sanz L, Lewis DR, Muday GK, Lorenzo O.** 2011. Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1 (*PIN1*)-dependent acropetal auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 18506–18511.
- Filleur S, Dorbe M-F, Cerezo M, Orsel M, Granier F, Gojon A, Daniel-Vedele F.** 2001. An *Arabidopsis* T-DNA mutant affected in *NRT2* genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS letters* **489**, 220–224.
- Fischer W-N, André B, Rentsch D, Krolkiewicz S, Tegeder M, Breitzkreuz K, Frommer WB.** 1998. Amino acid transport in plants. *Trends in Plant Science* **3**, 188–195.
- Forde BG.** 2002a. Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 203–24.
- Forde BG.** 2002b. The role of long-distance signalling in plant responses to nitrate and other nutrients. *Journal of Experimental Botany* **53**, 39–43.
- Forde BG.** 2014. Glutamate signalling in roots. *Journal of Experimental Botany* **65**, 779–787.
- Fougère-Danezan M, Joly S, Bruneau A, Gao X-F, Zhang L-B.** 2015. Phylogeny and biogeography of wild roses with specific attention to polyploids. *Annals of botany* **115**, 275–291.

- Fraga MF, Cañal MJ, Rodríguez R.** 2002. *In vitro* morphogenic potential of differently aged *Pinus radiata* trees correlates with polyamines and DNA methylation levels. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **70**, 139–145.
- Frak E.** 2002. Coupling sap flow velocity and amino acid concentrations as an alternative method to <sup>15</sup>N labeling for quantifying nitrogen remobilization by walnut trees. *Plant Physiology* **130**, 1043–1053.
- Frak E, Le Roux X, Millard P, Guillaumie S, Wendler R.** 2006. Nitrogen availability, local light regime and leaf rank effects on the amount and sources of N allocated within the foliage of young walnut (*Juglans nigra x regia*) trees. *Tree Physiology* **26**, 43–49.
- France Agri Mer.** 2015. Bilan annuel 2014 du commerce extérieur français des produits de l'horticulture, France Agri Mer, 14.
- France Agri Mer.** 2016. Bilan annuel 2015 du commerce extérieur français des produits de l'horticulture, France Agri Mer, 16.
- de la Fuente L, Conesa A, Lloret A, Badenes ML, Ríos G.** 2015. Genome-wide changes in histone H3 lysine 27 trimethylation associated with bud dormancy release in peach. *Tree Genetics & Genomes* **11**, 1–14.
- Furet P-M, Lothier J, Demotes-Mainard S, Travier S, Henry C, Guérin V, Vian A.** 2013. Light and nitrogen nutrition regulate apical control in *Rosa hybrida* L. *Journal of Plant Physiology* **171**, 7–13.
- Furet P-M.** 2013. Déterminisme trophique du gradient acrotone de débourrement chez *Rosa hybrida* L. en fonction de l'intensité lumineuse. Université d'Angers. 170.
- Furner IJ, Matzke M.** 2011. Methylation and demethylation of the *Arabidopsis* genome. **14**, 137–141.
- Fustec J, Beaujard F.** 2000. Effect of photoperiod and nitrogen supply on basal shoots development in *Rhododendron catawbiense*. *Biologia Plantarum* **43**, 511–515.
- Gambino G, Gribaudo I.** 2006. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant RNA as internal control. *Phytopathology* **96**, 1223–1229.
- Gambino G, Perrone I, Gribaudo I.** 2008. A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis* **19**, 520–525.
- Garbez M, Chéné Y, Belin E, Sigogne M, Labatte J-M, Hunault G, Symoneaux R, Rousseau D, Galopin G.** 2016. Predicting sensorial attribute scores of ornamental plants assessed in 3D through rotation on video by image analysis: A study on the morphology of virtual rose bushes. *Computers and Electronics in Agriculture* **121**, 331–346.
- Garbez M, Galopin G, Sigogne M, Favre P, Demotes-Mainard S, Symoneaux R.** 2015. Assessing the visual aspect of rotating virtual rose bushes by a labeled sorting task. *Food Quality and Preference* **40**, 287–295.

- Gaudin Z, Cerveau D, Marnet N, Bouchereau A, Delavault P, Simier P, Pouvreau J-B.** 2014. Robust method for investigating nitrogen metabolism of <sup>15</sup>N labeled amino acids using AccQ•Tag Ultra Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry: application to a parasitic plant-plant interaction. *Analytical Chemistry* **86**, 1138–1145.
- Gauffichon L, Masclaux-Daubresse C, Tcherkez G, Reisdorf-Cren M, Sakakibara Y, Hase T, Clément G, Avice JC, Grandjean O, Marmagne A, Boutet-Mercey S, Azzopardi M, Soulay F, Suzuki A.** 2013. *Arabidopsis thaliana* ASN2 encoding asparagine synthetase is involved in the control of nitrogen assimilation and export during vegetative growth: Nitrogen assimilation and translocation. *Plant, Cell & Environment* **36**, 328–342.
- Gauffichon L, Reisdorf-Cren M, Rothstein SJ, Chardon F, Suzuki A.** 2010. Biological functions of asparagine synthetase in plants. *Plant Science* **179**, 141–153.
- Gazzarrini S, Lejay L, Gojon A, Ninnemann O, Frommer WB, von Wirén N.** 1999. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell* **11**, 937–947.
- Gößler A, Kopriva S, Rennenberg H.** 2004. Regulation of nitrate uptake at the whole-tree level: interaction between nitrogen compounds, cytokinins and carbon metabolism. *Tree Physiology* **24**, 1313–1321.
- Gößler A, Schultze M, Schrempp S, Rennenberg H.** 1998. Interaction of phloem-translocated amino compounds with nitrate net uptake by the roots of beech (*Fagus sylvatica*) seedlings. *Journal of Experimental Botany* **49**, 1529–1537.
- Gößler A, Weber P, Schneider S, Rennenberg H.** 2003. Bidirectional exchange of amino compounds between phloem and xylem during long distance transport in Norway spruce trees (*Picea abies* L. Karst). *Journal of Experimental Botany* **54**, 1389–1397.
- Girault T, Abidi F, Sigogne M, Pelleschi-Travier S, Boumaza R, Sakr S, Leduc N.** 2010. Sugars are under light control during bud burst in *Rosa sp.*: photocontrol of sugars during bud burst. *Plant, Cell & Environment* **33**, 1339–1350.
- Girault T, Bergougnoux V, Combes D, Viemont J-D, Leduc N.** 2008. Light controls shoot meristem organogenic activity and leaf primordia growth during bud burst in *Rosa sp.* *Plant, Cell & Environment* **31**, 1534–1544.
- Girault T.** 2009. Etude du photocontrôle du débourrement du bourgeon chez le rosier (*Rosa sp. L*): impact de la lumière sur le métabolisme glucidique et l'élongation cellulaire. Université d'Angers. 281.
- Gloser V.** 2005. The consequences of lower nitrogen availability in autumn for internal nitrogen reserves and spring growth of *Calamagrostis epigejos*. *Plant Ecology* **179**, 119–126.
- Glykys J, Dzhalal V, Egawa K, Balena T, Saponjian Y, Kuchibhotla KV, Bacskai BJ, Kahle KT, Zeuthen T, Staley KJ.** 2014. Local impermeant anions establish the neuronal chloride concentration. *Science* **343**, 670–675.

- Gojon A, Krouk G, Perrine-Walker F, Laugier E.** 2011. Nitrate tranceptor(s) in plants. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2299 – 2308.
- Gojon A, Plassard C, Bussi C.** 1994. Root/shoot distribution of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> assimilation in herbaceous and woody species. In : A whole plant perspective on carbon–nitrogen interactions, ed. SPB Academic Publishing, The Hague, 131–147.
- Gomez L.** 2002. Contribution of vegetative storage proteins to seasonal nitrogen variations in the young shoots of peach trees (*Prunus persica* L. Batsch). *Journal of Experimental Botany* **53**, 2431–2439.
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pagès V, Dun EA, Pillot JP, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais JC, Bouwmeester H, Bécard G, Beveridge CA, Rameau C, Rochange SF.** 2008. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**, 189–194.
- Gonzalez-Grandio E, Poza-Carrion C, Sorzano COS, Cubas P.** 2013. *BRANCHED1* promotes axillary bud dormancy in response to shade in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **25**, 834–850.
- Grassi G, Millard P, Wendler R, Minotta G, Tagliavini M.** 2002. Measurement of xylem sap amino acid concentrations in conjunction with whole tree transpiration estimates spring N remobilization by cherry (*Prunus avium* L.) trees. *Plant, Cell & Environment* **25**, 1689–1699.
- Grelet G-A, Alexander IJ, Proe MF, Frossard J-S, Millard P.** 2001. Leaf habit influences nitrogen remobilization in *Vaccinium* species. *Journal of Experimental Botany* **52**, 993–1002.
- Guak S, Neilsen D, Millard P, Wendler R, Neilsen GH.** 2003. Determining the role of N remobilization for growth of apple (*Malus domestica* Borkh.) trees by measuring xylem sap N flux. *Journal of Experimental Botany* **54**, 2121–2131.
- Guan P, Ripoll J-J, Wang R, Vuong L, Bailey-Steinitz LJ, Ye D, Crawford NM.** 2017. Interacting TCP and NLP transcription factors control plant responses to nitrate availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, 2419–2424.
- Guan P, Wang R, Nacry P, Breton G, Kay SA, Pruneda-Paz JL, Davani A, Crawford NM.** 2014. Nitrate foraging by *Arabidopsis* roots is mediated by the transcription factor TCP20 through the systemic signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 15267–15272.
- Guérin V, Huché-Thélier L, Charpentier S.** 2007. Mobilisation of nutrients and transport via the xylem sap in a shrub (*Ligustrum ovalifolium*) during spring growth: N and C compounds and interactions. *Journal of Plant Physiology* **164**, 562–573.
- Gulmon SL, Chu CC.** 1981. The effects of light and nitrogen on photosynthesis, leaf characteristics, and dry matter allocation in the chaparral shrub, *Diplacus aurantiacus*. *Oecologia* **49**, 207–212.

- Guo C, Xu Y, Shi M, Lai Y, Wu X, Wang H, Zhu Z, Poethig RS, Wu G.** 2017. Repression of miR156 by miR159 regulates the timing of the juvenile-to-adult transition in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* **29**, 1293–1304.
- Guo H, Zhang W, Tian H, Zheng K, Dai X, Liu S, Hu Q, Wang X, Liu B, Wang S.** 2015. An auxin responsive CLE gene regulates shoot apical meristem development in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **6**, 1–10.
- Gutierrez JA, Pan Y-X, Koroniak L, Hiratake J, Kilberg MS, Richards NGJ.** 2006. An inhibitor of human asparagine synthetase suppresses proliferation of an L-Asparaginase-resistant leukemia cell line. *Chemistry & Biology* **13**, 1339–1347.
- Halaly T, Pang X, Batikoff T, Crane O, Keren A, Venkateswari J, Ogrodovitch A, Sadka A, Lavee S, Or E.** 2008. Similar mechanisms might be triggered by alternative external stimuli that induce dormancy release in grape buds. *Planta* **228**, 79–88.
- Hall SM, Hillman JR.** 1975. Correlative inhibition of lateral bud growth in *Phaseolus vulgaris* L. timing of bud growth following decapitation. *Planta* **123**, 137–143.
- Hallé F, Oldeman RAA.** 1970. Essai sur l'architecture et la dynamique de croissance des arbres tropicaux, ed. Centre de Documentation Regards, 178.
- Handschumacher RE, Bates CJ, Chang PK, Andrews AT, Fischer GA.** 1968. 5-Diazo-4-oxo-L-norvaline: reactive asparagine analog with biological specificity. *Science* **5**, 62–63.
- Hanson J, Hanssen M, Wiese A, Hendriks MMWB, Smeekens S.** 2007. The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of *ASPARAGINE SYNTHETASE1* and *PROLINE DEHYDROGENASE2*: bZIP11 affects metabolism of amino acids. *The Plant Journal* **53**, 935–949.
- Haroun SA, Shukry WM, El-Sawy O, others.** 2010. Effect of asparagine or glutamine on growth and metabolic changes in *Phaseolus vulgaris* under *in vitro* conditions. *Biosci. Res* **7**, 1–21.
- Harrison RB, Reis GG, Reis MD, Bernardo AL, Firme DJ.** 2000. Effect of spacing and age on nitrogen and phosphorus distribution in biomass of *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus pellita* and *Eucalyptus urophylla* plantations in southeastern Brazil. *Forest Ecology and Management* **133**, 167–177.
- Hayashi H, Chino M.** 1990. Chemical composition of phloem sap from the uppermost internode of the rice plant. *Plant and Cell Physiology* **31**, 247–251.
- Hayward A, Stirnberg P, Beveridge C, Leyser O.** 2009. Interactions between auxin and strigolactone in shoot branching control. *Plant Physiology* **151**, 400–412.
- Hendershot KL, Volenec JJ.** 1993. Nitrogen pools in taproots of *Medicago sativa* L. after defoliation. *Journal of Plant Physiology* **141**, 129–135.
- Henry C, Rabot A, Laloi M, Mortreau E, Sigogne M, Leduc N, Lemoine R, Sakr S, Vian A, Pelleschi-Travier S.** 2011. Regulation of *RhSUC2*, a sucrose transporter, is

- correlated with the light control of bud burst in *Rosa sp.* *Plant Cell & Environment* **34**, 1776–1789.
- Hernandez-Sebastia C.** 2005. Free amino acid profiles suggest a possible role for asparagine in the control of storage-product accumulation in developing seeds of low- and high-protein soybean lines. *Journal of Experimental Botany* **56**, 1951–1963.
- Herrera-Rodríguez MB, Maldonado JM, Pérez-Vicente R.** 2004. Light and metabolic regulation of *HAS1*, *HAS1.1* and *HAS2*, three asparagine synthetase genes in *Helianthus annuus*. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**, 511–518.
- Hikosaka K, Hanba YT, Hirose T, Terashima I.** 1998. Photosynthetic nitrogen-use efficiency in leaves of woody and herbaceous species. *Functional Ecology* **12**, 896–905.
- Hildebrandt TM, Nunes Nesi A, Araújo WL, Braun H-P.** 2015. Amino acid catabolism in plants. *Molecular Plant* **8**, 1563–1579.
- Horvath DP, Anderson JV, Chao WS, Foley ME.** 2003. Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. *Trends in Plant Science* **8**, 534–540.
- Horvath DP, Soto-Suárez M, Chao WS, Jia Y, Anderson JV.** 2005. Transcriptome analysis of paradormancy release in root buds of leafy spurge (*Euphorbia esula*). *Weed science* **53**, 795–801.
- Huché-Théliet L, Boumaza R, Demotes-Mainard S, Canet A, Symoneaux R, Douillet O, Guérin V.** 2011. Nitrogen deficiency increases basal branching and modifies visual quality of the rose bushes. *Scientia Horticulturae* **130**, 325–334.
- Hunt E, Gattolin S, Newbury HJ, Bale JS, Tseng H-M, Barrett DA, Pritchard J.** 2010. A mutation in amino acid permease *AAP6* reduces the amino acid content of the *Arabidopsis* sieve elements but leaves aphid herbivores unaffected. *Journal of Experimental Botany* **61**, 55–64.
- Ikeuchi H, Ahn Y-M, Otokawa T, Watanabe B, Hegazy L, Hiratake J, Richards NGJ.** 2012. A sulfoximine-based inhibitor of human asparagine synthetase kills l-asparaginase-resistant leukemia cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **20**, 5915–5927.
- Inagaki S, Miura-Kamio A, Nakamura Y, Lu F, Cui X, Cao X, Kimura H, Saze H, Kakutani T.** 2010. Autocatalytic differentiation of epigenetic modifications within the *Arabidopsis* genome. *The EMBO journal* **29**, 3496–3506.
- Iwata H, Gaston A, Remay A, Thouroude T, Jeauffre J, Kawamura K, Oyant LH-S, Araki T, Denoyes B, Foucher F.** 2012. The *TFL1* homologue *KSN* is a regulator of continuous flowering in rose and strawberry: continuous flowering in rose and strawberry. *The Plant Journal* **69**, 116–125.
- Jang J-C, León P, Zhou L, Sheen J.** 1997. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *The Plant Cell* **9**, 5–19.

- Johnson DA, Hill JP, Thomas MA.** 2006. The monosaccharide transporter gene family in land plants is ancient and shows differential subfamily expression and expansion across lineages. *BMC Evolutionary Biology* **6**, 1–20.
- de Jong M, George G, Ongaro V, Williamson L, Willetts B, Ljung K, McCulloch H, Leyser O.** 2014a. Auxin and strigolactone signaling are required for modulation of *Arabidopsis* shoot branching by nitrogen supply. *Plant Physiology* **166**, 384–395.
- de Jong F, Thodey K, Lejay LV, Bevan MW.** 2014b. Glucose elevates NITRATE TRANSPORTER2.1 protein levels and nitrate transport activity independently of its HEXOKINASE1-mediated stimulation of *NITRATE TRANSPORTER2.1* expression. *PLANT PHYSIOLOGY* **164**, 308–320.
- Kagawa A, Sugimoto A, Maximov TC.** 2006. Seasonal course of translocation, storage and remobilization of <sup>13</sup>C pulse-labeled photoassimilate in naturally growing *Larix gmelinii* saplings. *New Phytologist* **171**, 793–804.
- Kamada-Nobusada T, Makita N, Kojima M, Sakakibara H.** 2013. Nitrogen-dependent regulation of *de novo* cytokinin biosynthesis in rice: the role of glutamine metabolism as an additional signal. *Plant and Cell Physiology* **54**, 1881–1893.
- Kankel MW, Ramsey DE, Stokes TL, Flowers SK, Haag JR, Jeddloh JA, Riddle NC, Verbsky ML, Richards EJ.** 2003. *Arabidopsis MET1* cytosine methyltransferase mutants. *Genetics* **163**, 1109–1122.
- Kasai M.** 2008. Effect of growing soybean plants under continuous light on leaf photosynthetic rate and other characteristics concerning biomass production. *Journal of Agronomy* **7**, 156–162.
- Kato T.** 1981. Major nitrogen compounds transported in xylem vessels from roots to top in citrus trees. *Physiologia Plantarum* **52**, 275–279.
- Kato T, Yamagata M, Tsukahara S.** 1984. Seasonal variations in major nitrogenous components in buds, leaves, bark and wood of Satsuma mandarin trees. *Journal of the Japanese Society of Horticultural Science* **53**, 17–22.
- Kawamura K, Hibrand-Saint Oyant L, Crespel L, Thouroude T, Lalanne D, Foucher F.** 2010. Quantitative trait loci for flowering time and inflorescence architecture in rose. *Theoretical and applied genetics* **122**, 661–675.
- Kebrom TH, Mullet JE.** 2015. Photosynthetic leaf area modulates tiller bud outgrowth in *sorghum*: Bud outgrowth is sensitive to leaf area. *Plant, Cell & Environment* **38**, 1471–1478.
- Keilin T, Pang X, Venkateswari J, Halaly T, Crane O, Keren A, Ogradovitch A, Ophir R, Volpin H, Galbraith D, Or E.** 2007. Digital expression profiling of a grape-bud EST collection leads to new insight into molecular events during grape-bud dormancy release. *Plant Science* **173**, 446–457.
- Keller M, Koblet W.** 1995. Dry matter and leaf area partitioning, bud fertility and second season growth of *Vitis vinifera L.*: responses to nitrogen supply and limiting irradiance. *VITIS-Journal of Grapevine Research* **34**, 77–83.

- Khayat E, Zieslin N.** 1982. Environmental factors involved in the regulation of sprouting of basal buds in rose plants. *Journal of Experimental Botany* **33**, 1286–1292.
- Kiba T, Feria-Bourrellier A-B, Lafouge F, Lezhneva L, Boutet-Mercey S, Orsel M, Bréhaut V, Miller A, Daniel-Vedele F, Sakakibara H, Krap A.** 2012. The *arabidopsis* nitrate transporter NRT2.4 plays a double role in roots and shoots of nitrogen-starved plants. *The Plant Cell* **24**, 245–258.
- Kiba T, Taniguchi M, Imamura A, Ueguchi C, Mizuno T, Sugiyama T.** 1999. Differential expression of genes for response regulators in response to cytokinins and nitrate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **40**, 767–771.
- Kim TH, Ourry A, Boucaud J, Lemaire G.** 1992. Changes in source-sink relationship for nitrogen during regrowth of lucerne (*Medicago sativa* L.) following removal of shoots. *Functional Plant Biology* **18**, 593–602.
- King RW, Zeevaart JAD.** 1974. Enhancement of phloem exudation from cut petioles by chelating agents. *Plant Physiology* **53**, 96–103.
- Kinnersley AM, Turano FJ.** 2000. Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences* **19**, 479–509.
- Kiyosue T, Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 1998. *ERD6*, a cDNA clone for an early dehydration-induced gene of *Arabidopsis*, encodes a putative sugar transporter. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1370**, 187–191.
- Kohl S, Hollmann J, Blattner FR, Radchuk V, Andersch F, Steuernagel B, Schmutzer T, Scholz U, Krupinska K, Weber H.** 2012. A putative role for amino acid permeases in sink-source communication of barley tissues uncovered by RNA-seq. *BMC plant biology* **12**, 1–18.
- Kou HP, Li Y, Song XX, Ou XF, Xing SC, Ma J, Von Wettstein D, Liu B.** 2011. Heritable alteration in DNA methylation induced by nitrogen-deficiency stress accompanies enhanced tolerance by progenies to the stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Physiology* **168**, 1685–1693.
- Krall AS, Xu S, Graeber TG, Braas D, Christofk HR.** 2016. Asparagine promotes cancer cell proliferation through use as an amino acid exchange factor. *Nature Communications* **7**, 1–13.
- Krapp A, Berthome R, Orsel M, Mercey-Boutet S, Yu A, Castaings L, Elftieh S, Major H, Renou J-P, Daniel-Vedele F.** 2011. *Arabidopsis* roots and shoots show distinct temporal adaptation patterns toward nitrogen starvation. *Plant Physiology* **157**, 1255–1282.
- Krapp A, David LC, Chardin C, Girin T, Marmagne A, Leprince A-S, Chaillou S, Ferrario-Méry S, Meyer C, Daniel-Vedele F.** 2014. Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany* **65**, 789–798.
- Krouk G, Lacombe B, Bielach A, Perrine-Walker F, Malinska K, Mounier E, Hoyerova K, Tillard P, Leon S, Ljung K, Zazimalova E, Benkova E, Nacry P, Golon A.** 2010.

- Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Developmental Cell* **18**, 927–937.
- Kudora H, Suguiru T, Ito D.** 2002. Changes in hydrogen peroxide content in flower buds of Japanese pear (*Pyrus pirifolia Nakai*) in relation to breaking of endodormancy. *Journal of Japanese Society of Horticultural Science* **71**, 606–616.
- Kudryakova NV, Efimova MV, Danilova MN, Zubkova NK, Khripach VA, Kusnetsov VV, Kulaeva ON.** 2013. Exogenous brassinosteroids activate cytokinin signalling pathway gene expression in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation* **70**, 61–69.
- Kumar G, Rattan UK, Singh AK.** 2016. Chilling-mediated DNA methylation changes during dormancy and its release reveal the importance of epigenetic regulation during winter dormancy in apple (*Malus x domestica Borkh.*). *PLoS ONE* **11**, 1–25.
- Kwon CS, Chen C, Wagner D.** 2005. *WUSCHEL* is a primary target for transcriptional regulation by *SPLAYED* in dynamic control of stem cell fate in *Arabidopsis*. *Genes & development* **19**, 992–1003.
- Lam H-M, Hsieh M-H, Coruzzi G.** 1998. Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**, 345–353.
- Lam H-M, Peng SS, Coruzzi GM.** 1994. Metabolic regulation of the gene encoding glutamine-dependent asparagine synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **106**, 1347–1357.
- Landhäusser SM, Lieffers VJ.** 2003. Seasonal changes in carbohydrate reserves in mature northern *Populus tremuloides* clones. *Trees* **17**, 471–476.
- Lang GA, Early JD, Martin GC, Darnell RL.** 1987. Endo-, para-, and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *HortScience* **22**, 371–377.
- Law DR, Suttle JC.** 2004. Changes in histone H3 and H4 multi-acetylation during natural and forced dormancy break in potato tubers. *Physiologia Plantarum* **120**, 642–649.
- Lawrence SD, Cooke JEK, Greenwood JS, Korhnak TE, Davis JM.** 2001. Vegetative storage protein expression during terminal bud formation in poplar. *Canadian Journal of Forest Research* **31**, 1098–1103.
- Le Hir R, Spinner L, Klemens PA, et al.** 2015. Disruption of the sugar transporters AtSWEET11 and AtSWEET12 affects vascular development and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **8**, 1687–1690.
- Lea PJ, Chen Z-H, Leegood RC, Walker RP.** 2001. Does phosphoenolpyruvate carboxykinase have a role in both amino acid and carbohydrate metabolism? *Amino acids* **20**, 225–241.
- Lea PJ, Sodek L, Parry MAJ, Shewry PR, Halford NG.** 2007. Asparagine in plants. *Annals of Applied Biology* **150**, 1–26.

- Lee D-K, Parrott DL, Adhikari E, Fraser N, Sieburth LE.** 2016a. The mobile bypass signal arrests shoot growth by disrupting SAM maintenance, cytokinin signaling, and WUS expression. *Plant Physiology*, pp.00474.2016.
- Lee D-K, Van Norman JM, Murphy C, Adhikari E, Reed JW, Sieburth LE.** 2012. In the absence of BYPASS1-related gene function, the *bps* signal disrupts embryogenesis by an auxin-independent mechanism. *Development* **139**, 805–815.
- Lee B-R, Zhang Q, Bae D-W, Kim T-H.** 2016b. Pod removal responsive change in phytohormones and its impact on protein degradation and amino acid transport in source leaves of *Brassica napus*. *Plant Physiology and Biochemistry* **106**, 159–164.
- Leprince O, Sator P, Vu BL, Buitink J.** 2004. The role of sugars and hexose phosphorylation in regulating the re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Cucumis sativa* and *Medicago truncatula*. *Physiologia Plantarum* **122**, 200–209.
- Léran S, Varala K, Boyer J-C, Chiurazzi M, Crawford N, Daniel-Vedele F, David L, Dickstein R, Fernandez E, Forde B.** 2014. A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends in plant science* **19**, 5–9.
- Li W, Liu J, Ashraf U, Li G, Li Y, Lu W, Gao L, Han F, Hu J.** 2016a. Exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) application improved early growth, net photosynthesis, and associated physio-biochemical events in maize. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1–13.
- Li Y, Mukherjee I, Thum KE, Tanurdzic M, Katari MS, Obertello M, Edwards MB, McCombie WR, Martienssen RA, Coruzzi GM.** 2015. The histone methyltransferase SDG8 mediates the epigenetic modification of light and carbon responsive genes in plants. *Genome Biology* **16**, 79–94.
- Li X, Xia K, Liang Z, Chen K, Gao C, Zhang M.** 2016b. MicroRNA393 is involved in nitrogen-promoted rice tillering through regulation of auxin signal transduction in axillary buds. *Scientific Reports* **6**, 1–12.
- Liang G, He H, Yu D.** 2012. Identification of nitrogen starvation-responsive microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **7**, 1–11.
- Liao S-C, Lin C-S, Wang A-Y, Sung H-Y.** 2013. Differential expression of genes encoding acid invertases in multiple shoots of bamboo in response to various phytohormones and environmental factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**, 4396–4405.
- Limami AM, Planchet E.** 2015. Amino acid synthesis under abiotic stress. *Amino acids in higher plants*. D’Mello J.P.F., 262–276.
- Li-Marchetti C, Le Bras C, Relion D, Citerne S, Huché-Thélier L, Sakr S, Morel P, Crespel L.** 2015a. Genotypic differences in architectural and physiological responses to water restriction in rose bush. *Frontiers in Plant Science* **6**, doi: 10.3389/fpls.2015.00355

- Li-Marchetti C, Le Bras C, Relion D, Sakr S, Morel P, Crespel L.** 2015b. Effects of genotype× environment interaction on plant architecture in rose. XXV International EUCARPIA Symposium Section Ornamentals: Crossing Borders 1087. 163–169.
- Lin IW, Sosso D, Chen L-Q, Gase K, Kim SG, Kessler D, Klinkenberg PM, Gorder MK, Hou BH, Qu XQ, Carter CJ, Baldwin IT, Frommer WB.** 2014. Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter SWEET9. *Nature* **508**, 546–549.
- Linde M, Hattendorf A, Kaufmann H, Debener T.** 2006. Powdery mildew resistance in roses: QTL mapping in different environments using selective genotyping. *Theoretical and applied genetics* **113**, 1081–1092.
- Liorzou M, Pernet A, Li S, Chastellier A, Thouroude T, Michel G, Malécot V, Gaillard S, Briée C, Foucher F.** 2016. Nineteenth century French rose (*Rosa sp.*) germplasm shows a shift over time from a European to an asian genetic background. *Journal of Experimental Botany* **67**, 4711–4725.
- Liu Y, Gu D, Ding Y, Wang Q, Li G, Wang S.** 2011. The relationship between nitrogen, auxin and cytokinin in the growth regulation of rice (*Oryza sativa*) tiller buds. *Australian Journal of Crop Science* **5**, 1019–1026.
- Liu W-Z, Kong D-D, Gu X-X, Gao HB, Wang JZ, Xia M, Gao Q, Tian LL, Xu ZH, Bao F, Hu Y, Ye NS, Pei ZM, He YK.** 2013. Cytokinins can act as suppressors of nitric oxide in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 1548–1553.
- Liu KH, Niu Y, Konishi M, Wu Y, Du H, Sun Chung H, Li L, Boudsocq M, McCormack M, Maekawa S, Ishida T, Zhang C, Shokat K, Yanagisawa S, Sheen J.** 2017. Discovery of nitrate–CPK–NLP signalling in central nutrient–growth networks. *Nature* **545**, 311–316.
- Liu K-H, Tsay Y-F.** 2003. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *The EMBO journal* **22**, 1005–1013.
- Loayza-Puch F, Rooijers K, Buil LCM, et al.** 2016. Tumour-specific proline vulnerability uncovered by differential ribosome codon reading. *Nature* **530**, 490–494.
- 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**, 1–8.
- Lortie CJ, Aarssen LW.** 1997. Apical dominance as an adaptation in *Verbascum thapsus*: effects of water and nutrients on branching. *International Journal of Plant Sciences* **158**, 461–464.
- Lothier J, Gaufichon L, Sormani R, Lemaître T, Azzopardi M, Morin H, Chardon F, Reisdorf-Cren M, Avice J-C, Masclaux-Daubresse C.** 2011. The cytosolic glutamine synthetase GLN1;2 plays a role in the control of plant growth and ammonium homeostasis in *Arabidopsis* rosettes when nitrate supply is not limiting. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1375–1390.

- Lu F, Cui X, Zhang S, Liu C, Cao X.** 2010. JMJ14 is an H3K4 demethylase regulating flowering time in *Arabidopsis*. *Cell research* **20**, 387.
- Lu F, Li G, Cui X, Liu C, Wang X-J, Cao X.** 2008. Comparative analysis of JmjC domain-containing proteins reveals the potential histone demethylases in *Arabidopsis* and rice. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**, 886–896.
- Lu YL, Xu YC, Shen QR, Dong CX.** 2009. Effects of different nitrogen forms on the growth and cytokinin content in xylem sap of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings. *Plant and Soil* **315**, 67–77.
- Ludovici KH, Allen HL, Albaugh TJ, Dougherty PM.** 2002. The influence of nutrient and water availability on carbohydrate storage in loblolly pine. *Forest Ecology and Management* **159**, 261–270.
- Luo L, Pan S, Liu X, Wang H, Xu G.** 2017. Nitrogen deficiency inhibits cell division-determined elongation, but not initiation, of rice tiller buds. *Israel Journal of Plant Sciences*, 1–9.
- Ma Q, Longnecker N, Dracup M.** 1997. Nitrogen deficiency slows leaf development and delays flowering in narrow-leafed lupin. *Annals of Botany* **79**, 403–409.
- MacKenzie DJ, McLean MA, Mukerji S, Green M.** 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease* **81**, 222–226.
- Magne K, Lothier J.** 2011. Etude de la remobilisation des composés azotés chez le rosier buisson (*Rosa hybrida* L.) en réponse au débourrement. Université d'Angers, 31.
- Mair A, Pedrotti L, Wurzinger B, Anrather D, Simeunovic A, Weiste C, Valerio C, Dietrich K, Kirchler T, Nägele T, Carbajosa JV, Hanson J, Baena-González E, Chaban C, Weckwerth W, Dröge-Laser W, Teige M.** 2015. SnRK1-triggered switch of bZIP63 dimerization mediates the low-energy response in plants. *Elife* **4**, 1–33.
- Malaguti D, Millard P, Wendler R, Hepburn A, Tagliavini M.** 2001. Translocation of amino acids in the xylem of apple (*Malus domestica* Borkh.) trees in spring as a consequence of both N remobilization and root uptake. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1665–1671.
- Mano Y, Nemoto K.** 2012. The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany* **63**, 2853–2872.
- Marquat C, Vandamme M, Gendraud M, Pétel G.** 1999. Dormancy in vegetative buds of peach: relation between carbohydrate absorption potentials and carbohydrate concentration in the bud during dormancy and its release. *Scientia Horticulturae* **79**, 151–162.
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gauffichon 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, Orsel M.** 2008. Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. *Plant Biology* **10**, 23–36.
- Mason HS, Mullet JE.** 1990. Expression of two soybean vegetative storage protein genes during development and in response to water deficit, wounding, and jasmonic acid. *The Plant Cell* **2**, 569–579.
- Mason MG, Ross JJ, Babst BA, Wienclaw BN, Beveridge CA.** 2014. Sugar demand, not auxin, is the initial regulator of apical dominance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 6092–6097.
- Maurel K, Leite GB, Bonhomme M, Guilliot A, Rageau R, Pétel G, Sakr S.** 2004. Trophic control of bud break in peach (*Prunus persica*) trees: a possible role of hexoses. *Tree Physiology* **24**, 579–588.
- Médiène S, Pagès L, Jordan M-O, Le Bot J, Adamowicz S.** 2002. Influence of nitrogen availability on shoot development in young peach trees (*Prunus persica* L.). *Trees* **16**, 547–554.
- Meijón M, Feito I, Valledor L, Rodríguez R, Cañal MJ.** 2010. Dynamics of DNA methylation and Histone H4 acetylation during floral bud differentiation in *azalea*. *BMC plant biology* **10**, 10–24.
- Meijón M, Valledor L, Santamaría E, Testillano PS, Risueño MC, Rodríguez R, Feito I, Cañal MJ.** 2009. Epigenetic characterization of the vegetative and floral stages of azalea buds: Dynamics of DNA methylation and histone H4 acetylation. *Journal of Plant Physiology* **166**, 1624–1636.
- Messeguer R, Ganal MW, Steffens JC, Tanksley SD.** 1991. Characterization of the level, target sites and inheritance of cytosine methylation in tomato nuclear DNA. *Plant Molecular Biology* **16**, 753–770.
- Meuriot F, Avice J-C, Decau M-L, Simon J-C, Lainé P, Volenec JJ, Ourry A.** 2003. Accumulation of N reserves and vegetative storage protein (VSP) in taproots of non-nodulated alfalfa (*Medicago sativa* L.) are affected by mineral N availability. *Plant Science* **165**, 709–718.
- Meuriot F, Avice JC, Simon JC, Laine P, Decau ML, Ourry A.** 2004. Influence of initial organic N reserves and residual leaf area on growth, N uptake, N partitioning and N storage in Alfalfa (*Medicago sativa*) during post-cutting regrowth. *Annals of Botany* **94**, 311–321.
- Meyer C, Stitt M.** 2001. Nitrate reduction and signalling. *Plant nitrogen*, Springer, 37–59.
- Meynet J.** 2001. Les rosiers cultivés, une très longue histoire d'exploitation de la biodiversité seulement pour le plaisir et l'art de vivre. *Les Dossiers de l'environnement de l'INRA*, 113–118.
- Millard P.** 1996. Ecophysiology of the internal cycling of nitrogen for tree growth. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **159**, 1–10.

- Millard P, Grelet G.** 2010. Nitrogen storage and remobilization by trees: ecophysiological relevance in a changing world. *Tree Physiology* **30**, 1083–1095.
- Millard P, Hester A, Wendler R, Baillie G.** 2001. Interspecific defoliation responses of trees depend on sites of winter nitrogen storage. *Functional Ecology* **15**, 535–543.
- Millard P, Nielsen GH.** 1989. The influence of nitrogen supply on the uptake and remobilization of stored N for the seasonal growth of apple trees. *Annals of Botany* **63**, 301–309.
- Millard P, Proe MF.** 1993. Nitrogen uptake, partitioning and internal cycling in *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. as influenced by nitrogen supply. *New Phytologist* **125**, 113–119.
- Millard P, Thomson CM.** 1989. The effect of the autumn senescence of leaves on the internal cycling of nitrogen for the spring growth of apple trees. *Journal of Experimental Botany* **40**, 1285–1289.
- Millard P, Wendler R, Grassi G, Grelet G-A, Tagliavini M.** 2006. Translocation of nitrogen in the xylem of field-grown cherry and poplar trees during remobilization. *Tree Physiology* **26**, 527–536.
- Millard P, Wendler R, Hepburn A, Smith A.** 1998. Variations in the amino acid composition of xylem sap of *Betula pendula* Roth. trees due to remobilization of stored N in the spring. *Plant, Cell and Environment* **21**, 715–722.
- Miura A, Nakamura M, Inagaki S, Kobayashi A, Saze H, Kakutani T.** 2009. An Arabidopsis jmjC domain protein protects transcribed genes from DNA methylation at CHG sites. *The EMBO journal* **28**, 1078–1086.
- Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T.** 2004. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *The Plant Journal* **37**, 128–138.
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Chen IH, Jones T, Sheen J.** 2003. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. **300**, 332–336.
- Morange M.** 2000. Protéines chaperones. *Médecine & Sciences* **16**, 630–634.
- Morel P, Crespel L, Galopin G, Moulia B.** 2012. Effect of mechanical stimulation on the growth and branching of garden rose. *Scientia Horticulturae* **135**, 59–64.
- Morot-Gaudry J-F, Pelletier G, Caboche M, Nussaume L, Traas J, Rameau C, Laufs P, Dumas C.** 2009. Le développement végétatif des plantes. Académie des sciences de l'Institut de France, Paris. Académie des sciences de l'Institut de France, Paris, 7.
- Morris SE.** 2005. Auxin dynamics after decapitation are not correlated with the initial growth of axillary buds. *Plant Physiology* **138**, 1665–1672.

- Morvan-Bertrand A, Boucaud J, Prud'homme M-P.** 1999. Influence of initial levels of carbohydrates, fructans, nitrogen, and soluble proteins on regrowth of *Lolium perenne* L. cv. *Bravo* following defoliation. *Journal of Experimental Botany* **50**, 1817–1826.
- Muller B, Touraine B.** 1992. Inhibition of nitrate uptake by various phloem-translocated amino acids in *Soybean* seedlings. *Journal of Experimental Botany* **43**, 617–623.
- Müller D, Waldie T, Miyawaki K, To JPC, Melnyk CW, Kieber JJ, Kakimoto T, Leyser O.** 2015. Cytokinin is required for escape but not release from auxin mediated apical dominance. *The Plant Journal* **82**, 874–886.
- Müller, Leyser.** 2011. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Annals of Botany* **107**, 1203–1212.
- Murashige T, Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473–497.
- Nakamura M, Yamada M, Hirota Y, Sugimoto K, Oka A, Takanami M.** 1981. Nucleotide sequence of the *asnA* gene coding for asparagine synthetase of *E. coli* K-12. *Nucleic acids research* **9**, 4669–4676.
- Neilsen D, Millard P, Neilsen GH, Hogue EJ.** 1997. Sources of N for leaf growth in a high-density apple (*Malus domestica*) orchard irrigated with ammonium nitrate solution. *Tree Physiology* **17**, 733–739.
- Nemhauser JL, Mockler TC, Chory J.** 2004. Interdependency of Brassinosteroid and Auxin Signaling in *Arabidopsis*. *PLoS Biology* **2**, 1460-1471.
- Nigam SN, McIntyre GI.** 1977. Apical dominance in the rhizome of *Agropyron repens*. The relation of amino acid composition to bud activity. *Canadian Journal of Botany* **55**, 2001–2010.
- Nii N.** 1997. Changes of starch and sorbitol in leaves before and after removal of fruits from peach trees. *Annals of Botany* **79**, 139–144.
- Nir G, Shulman Y, Fanberstein L, Lavee S.** 1986. Changes in the activity of catalase (EC 1.11.1.6) in relation to the dormancy of grapevine (*Vitis vinifera* L.) buds. *Plant Physiology* **81**, 1140–1142.
- Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, Marquez-Garcia B, Queval G, Foyer CH.** 2012. Glutathione in plants: an integrated overview: Glutathione status and functions. *Plant, Cell & Environment* **35**, 454–484.
- Noquet C, Avice J-C, Ourry A, Volenec JJ, Cunningham SM, Boucaud J.** 2001. Effects of environmental factors and endogenous signals on N uptake, N partitioning and taproot vegetative storage protein accumulation in *Medicago sativa*. *Functional Plant Biology* **28**, 279–287.
- Oh SD, Choi DG.** 1988. Content of protein-amino acids in the buds and effect of trunk injection treatment of asparagine, arginine and abscisic acid on development of spur buds and flower differentiation in apple trees. *Journal Of Korean Society of Horticultural Science* **29**, 86–94.

- Ohashi M, Ishiyama K, Kusano M, Fukushima A, Kojima S, Hanada A, Kanno K, Hayakawa T, Seto Y, Kyojuka J, Yamaguchi S, Yamaya T.** 2015. Lack of cytosolic glutamine synthetase1;2 in vascular tissues of axillary buds causes severe reduction in their outgrowth and disorder of metabolic balance in rice seedlings. *The Plant Journal* **81**, 347–356.
- Ohashi M, Ishiyama K, Kojima S, Kojima M, Sakakibara H, Yamaya T, Hayakawa T.** 2017. Lack of cytosolic glutamine synthetase1;2 activity reduces nitrogen-dependent biosynthesis of cytokinin required for axillary bud outgrowth in rice seedlings. *Plant and Cell Physiology* **58**, 679–690.
- Ohkubo Y, Tanaka M, Tabata R, Ogawa-Ohnishi M, Matsubayashi Y.** 2017. Shoot-to-root mobile polypeptides involved in systemic regulation of nitrogen acquisition. *Nature Plants* **3**, 1–6.
- Ojima DS, Schimel DS, Parton WJ, Owensby CE.** 1994. Long- and short-term effects of fire on nitrogen cycling in tallgrass prairie. *Biogeochemistry* **24**, 67–84.
- Okamoto S, Tabata R, Matsubayashi Y.** 2016. Long-distance peptide signaling essential for nutrient homeostasis in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **34**, 35–40.
- Oldeman RAA.** 1974. L'architecture de la foret guyanaise. *Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer* **73**, 204.
- Orsel M, Krapp A, Daniel-Vedele F.** 2002. Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant Physiology* **129**, 886–896.
- Ortiz-Morea FA, Vicentini R, Silva GFF, Silva EM, Carrer H, Rodrigues AP, Nogueira FTS.** 2013. Global analysis of the sugarcane microtranscriptome reveals a unique composition of small RNAs associated with axillary bud outgrowth. *Journal of Experimental Botany* **64**, 2307–2320.
- Osabe K, Clement JD, Bedon F, Pettolino FA, Ziolkowski L, Llewellyn DJ, Finnegan EJ, Wilson IW.** 2014. Genetic and DNA methylation changes in cotton (*Gossypium*) genotypes and tissues. *PLoS ONE* **9**. 1-11.
- Ou X, Zhuang T, Yin W, Miao Y, Wang B, Zhang Y, Lin X, Xu C, von Wettstein D, Rustgi S, Liu B.** 2015. DNA methylation changes induced in rice by exposure to high concentrations of the nitric oxide modulator, sodium nitroprusside. *Plant Molecular Biology Reporter* **33**, 1428–1440.
- Ourry A, Boucaud J, Duyme M.** 1990. Sink control of nitrogen uptake and assimilation during regrowth after-cutting of ryegrass (*Lolium perenne L.*). *Plant Cell & Environment* **13**, 185–189.
- Ourry A, Boucaud J, Salette J.** 1988. Nitrogen mobilization from stubble and roots during re-growth of defoliated perennial ryegrass. *Journal of Experimental Botany* **39**, 803–809.
- Pal PK, Prasad R, Pathania V.** 2013. Effect of decapitation and nutrient applications on shoot branching, yield, and accumulation of secondary metabolites in leaves of *Stevia rebaudiana Bertoni*. *Journal of Plant Physiology* **170**, 1526–1535.

- Palanivelu R, Brass L, Edlund AF, Preuss D.** 2003. Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an *Arabidopsis* gene that controls GABA levels. *Cell* **114**, 47–59.
- Pécricx Y, Rallo G, Folzer H, Cigna M, Gudin S, Le Bris M.** 2011. Polyploidization mechanisms: temperature environment can induce diploid gamete formation in *Rosa sp.* *Journal of Experimental Botany* **62**, 3587–3597.
- Peng M, Cui Y, Bi Y-M, Rothstein SJ.** 2006. AtMBD9: a protein with a methyl-CpG-binding domain regulates flowering time and shoot branching in *Arabidopsis*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **46**, 282–296.
- Perrin F, Brahem M, Dubois-Laurent C, Huet S, Jourdan M, Geoffriau E, Peltier D, Gagné S.** 2016. Differential pigment accumulation in carrot leaves and roots during two growing periods. *Journal of agricultural and food chemistry* **64**, 906–912.
- Phillips DA, Center DM, Jones MB.** 1983. Nitrogen turnover and assimilation during regrowth in *Trifolium subterraneum L.* and *Bromus mollis L.* *Plant Physiology* **71**, 472–476.
- Planchet E, Kaiser WM.** 2006. Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources. *Journal of Experimental Botany* **57**, 3043–3055.
- Plaut Z, Mayoral ML, Reinhold L.** 1987. Effect of altered sink: source ratio on photosynthetic metabolism of source leaves. *Plant Physiology* **85**, 786–791.
- Pollmann S, Neu D, Weiler EW.** 2003. Molecular cloning and characterization of an amidase from *Arabidopsis thaliana* capable of converting indole-3-acetamide into the plant growth hormone, indole-3-acetic acid. *Phytochemistry* **62**, 293–300.
- Porter NG.** 1981. The directional control of sucrose and asparagine transport in lupin by abscisic acid. *Physiologia plantarum* **53**, 279–284.
- Porter BW, Zhu YJ, Webb DT, Christopher DA.** 2009. Novel thigmomorphogenetic responses in *Carica papaya*: touch decreases anthocyanin levels and stimulates petiole cork outgrowths. *Annals of Botany* **103**, 847–858.
- Prasad TK, Li X, Abdel-Rahman AM, Hosokawa Z, Cloud NP, Lamotte CE, Cline MG.** 1993. Does auxin play a role in the release of apical dominance by shoot inversion in *Ipomoea nil* ? *Annals of Botany* **71**, 223–229.
- Pratelli R, Pilot G.** 2014. Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. *Journal of Experimental Botany* **65**, 5535–5556.
- Proietti P, Tombesi A.** 1996. Effects of gibberellic acid, asparagine and glutamine on flower bud induction in olive. *Journal of Horticultural Science* **71**, 383–388.
- Pysh LD, Wysocka-Diller JW, Camilleri C, Bouchez D, Benfey PN.** 1999. The *GRAS* gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the *SCARECROW-LIKE* genes. *The Plant Journal* **18**, 111–119.

- Rabot A, Henry C, Baaziz KB, Mortreau E, Azri W, Lothier J, Hamama L, Boumaza R, Leduc N, Pelleschi-Travier S, Le Gourrierec J, Sakr S.** 2012. Insight into the role of sugars in bud burst under light in the rose. *Plant and Cell Physiology* **53**, 1068–1082.
- Rachmilevitch S, Cousins A, Bloom A.** 2004. Proceedings of the National Academy of Sciences **101**, 11506–11510.
- Rajapakse S, Byrne DH, Zhang L, Anderson N, Arumuganathan K, Ballard RE.** 2001. Two genetic linkage maps of tetraploid roses. *Theoretical and Applied Genetics* **103**, 575–583.
- Rameau C, Bertheloot J, Leduc N, Andrieu B, Foucher F, Sakr S.** 2015. Multiple pathways regulate shoot branching. *Frontiers in Plant Science* **5**, 1–15.
- Ramesh SA, Tyerman SD, Xu B, Bose J, Kaur S, Conn V, Domingos P, Ullah S, Wege S, Shabala S, Feijó JA, Ryan PR, Gillham M.** 2015. GABA signalling modulates plant growth by directly regulating the activity of plant-specific anion transporters. *Nature Communications* **6**, 7879–7888.
- Randoux M, Davière J-M, Jeuffre J, Thouroude T, Pierre S, Toualbia Y, Perrotte J, Reynoird JP, Jammes MJ, Hibrand-Saint Oyant L, Foucher F.** 2014. RoKSN, a floral repressor, forms protein complexes with RoFD and RoFT to regulate vegetative and reproductive development in rose. *New Phytologist* **202**, 161–173.
- Randoux M, Jeuffre J, Thouroude T, Vasseur F, Hamama L, Juchaux M, Sakr S, Foucher F.** 2012. Gibberellins regulate the transcription of the continuous flowering regulator, *RoKSN*, a rose *TFL1* homologue. *Journal of Experimental Botany* **63**, 6543–6554.
- Raper CD, Thomas JF, Tolley-Henry L, Rideout JW.** 1988. Assessment of an apparent relationship between availability of soluble carbohydrates and reduced nitrogen during floral initiation in tobacco. *Botanical gazette* **149**, 289–294.
- Reed RC, Brady SR, Muday GK.** 1998. Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **118**, 1369–1378.
- Ren Y, Roy S, Ding Y, Iqbal J, Broome JD.** 2004. Methylation of the asparagine synthetase promoter in human leukemic cell lines is associated with a specific methyl binding protein. *Oncogene* **23**, 3953–3961.
- Rentsch D, Schmidt S, Tegeder M.** 2007. Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. *FEBS Letters* **581**, 2281–2289.
- Richards D, Rowe RN.** 1977. Root-shoot interactions in peach: the function of the root. *Annals of Botany* **41**, 1211–1216.
- Rideout J, Raper C, Miner G.** 1992. Changes in ratio of soluble sugars and free amino nitrogen in the apical meristem during floral transition of tobacco. *International journal of plant sciences* **153**, 78–88.

- Rinne P, Tuominen H, Junttila O.** 1994. Seasonal changes in bud dormancy in relation to bud morphology, water and starch content, and abscisic acid concentration in adult trees of *Betula pubescens*. *Tree Physiology* **14**, 549–561.
- Ritchie ME, Tilman D, Knops JMH.** 1998. Herbivore effects on plant and nitrogen dynamics in oak savanna. *Ecological Society of America* **79**, 165–177.
- Robaglia C, Thomas M, Meyer C.** 2012. Sensing nutrient and energy status by SnRK1 and TOR kinases. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, 301–307.
- Robert F, Pétel G, Risser G, Gendraud M.** 1997. Determination of the growth potential of strawberry plants (*Fragaria ananassa Duch.*) by morphological and nucleotide measurements in relation to chilling. *Canadian journal of plant science* **77**, 127–132.
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM.** 2002. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Experimental Botany* **53**, 103–110.
- Roitsch T, Ehneß R.** 2000. Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regulation* **32**, 359–367.
- Roman H, Girault T, Gourrierc JL, Leduc N.** 2017. *In silico* analysis of three expansin gene promoters reveals two hubs controlling light and cytokinins response during bud outgrowth. *Plant Signaling & Behavior* **12**, 1–14.
- Roman H, Girault T, Barbier F, Péron T, Brouard N, Pěňčík A, Novák O, Vian A, Sakr S, Lothier J, Le Gourrierc J, Leduc N.** 2016. Cytokinins are initial targets of light in the control of bud outgrowth. *Plant Physiology* **172**, 489–509.
- Roman H, Rapicault M, Miclot AS, Larenaudie M, Kawamura K, Thouroude T, Chastellier A, Lemarquand A, Dupuis F, Foucher F, Loustau S, Hibrand-Saint Oyant L.** 2015. Genetic analysis of the flowering date and number of petals in rose. *Tree Genetics & Genomes* **11**, 1–13.
- Ruiz-García L, Cervera MT, Martínez-Zapater JM.** 2005. DNA methylation increases throughout *Arabidopsis* development. *Planta* **222**, 301–306.
- Sachs T, Thimann KV.** 1964. Release of lateral buds from apical dominance. *Nature* **201**, 939–940.
- Sachs T, Thimann KV.** 1967. The role of auxins and cytokinins in the release of buds from dominance. *American Journal of Botany* **54**, 136–144.
- Sagi M, Davydov O, Orazova S, Yesbergenova Z, Ophir R, Stratmann JW, Fluhr R.** 2004. Plant respiratory burst oxidase homologs impinge on wound responsiveness and development in *Lycopersicon esculentum*. *The Plant Cell* **16**, 616–628.
- Sagisaka S.** 1987. Amino acid pools in herbaceous plants at the wintering stage and at the beginning of growth. *Plant and Cell Physiology* **28**, 171–178.

- Sakakibara H, Suzuki M, Takei K, Deji A, Taniguchi. M, Sugiyama T.** 1998. A response-regulator homologue possibly involved in nitrogen signal transduction mediated by cytokinin in maize. *The Plant Journal* **14**, 337–344.
- Sakihama Y, Nakamura S, Yamasaki H.** 2002. Nitric oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative NO production pathway in photosynthetic organisms. *Plant and Cell Physiology* **43**, 290–297.
- Salaün M, Guérin V, Huché-Théliet L, Charpentier S, Dily FL.** 2005. Nitrogen storage and mobilisation for spring growth in *Ligustrum* cultivated in container. *Scientia Horticulturae* **103**, 461–471.
- Santamaría E, Hasbún R, Valera J, Meijón M, Valledor L, Rodríguez JL, Toorop PE, Cañal J, Rodríguez R.** 2009. Acetylated H4 histone and genomic DNA methylation patterns during bud set and bud burst in *Castanea sativa*. *Journal of Plant Physiology* **166**, 1360–1369.
- Santamaria ME, Rodriguez R, Canal MJ, Toorop PE.** 2011. Transcriptome analysis of chestnut (*Castanea sativa*) tree buds suggests a putative role for epigenetic control of bud dormancy. *Annals of Botany* **108**, 485–498.
- Sanz L, Albertos P, Mateos I, Sánchez-Vicente I, Lechón T, Fernández-Marcos M, Lorenzo O.** 2015. Nitric oxide (NO) and phytohormones crosstalk during early plant development. *Journal of Experimental Botany* **66**, 2857–2868.
- Sauter JJ, van Cleve B.** 1992. Seasonal variation of amino acids in the xylem sap of ‘*Populus x canadensis*’ and its relation to protein body mobilization. *Trees* **7**, 26–32.
- Scariot V, Akkak A, Botta R.** 2006. Characterization and genetic relationships of wild species and old garden roses based on microsatellite analysis. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **131**, 66–73.
- Schnyder H, de Visser R.** 1999. Fluxes of reserve-derived and currently assimilated carbon and nitrogen in perennial ryegrass recovering from defoliation. The regrowing tiller and its component functionally distinct zones. *Plant Physiology* **119**, 1423–1436.
- Scofield MA, Lewis WS, Schuster SM.** 1990. Nucleotide sequence of *Escherichia coli asnB* and deduced amino acid sequence of asparagine synthetase B. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 12895–12902.
- Seale M, Bennett T, Leyser O.** 2017. *BRC1* expression regulates bud activation potential but is not necessary or sufficient for bud growth inhibition in *Arabidopsis*. *Development* **144**, 1661–1673.
- Seligman K, Saviani EE, Oliveira HC, Pinto-Maglio CAF, Salgado I.** 2008. Floral transition and nitric oxide emission during flower development in *Arabidopsis thaliana* is affected in nitrate reductase-deficient plants. *Plant and Cell Physiology* **49**, 1112–1121.
- Sergeeva LI, Keurentjes JJ, Bentsink L, Vonk J, van der Plas LH, Koornneef M, Vreugdenhil D.** 2006. Vacuolar invertase regulates elongation of *Arabidopsis thaliana*

roots as revealed by QTL and mutant analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**, 2994–2999.

**Sheperd RE.** 1954. History of the Rose : old roses series. Ed. E. M. Coleman, California University **77**, 264.

**Shtratnikova VY, Kudryakova NV, Kudoyarova GR, Korobova AV, Akhiyarova GR, Danilova MN, Kusnetsov VV, Kulaeva ON.** 2015. Effects of nitrate and ammonium on growth of *Arabidopsis thaliana* plants transformed with the *ARR5::GUS* construct and a Role for cytokinins in suppression of disturbances induced by the presence of ammonium. Физиология растений **62**, 792–803.

**Shulaev V, Sargent DJ, Crowhurst RN, Shulaev V, Sargent DJ, Crowhurst RN, Mockle TC, Folkerts O, Delcher AL, Jaiswal P, Mockaitis K, Liston A, Mane SP, Burns P, Davis TM, Slovin JP, Bassil N, Hellens RP, Evans C, Harkins T, Kodira C, Desany B, Crasta OR, Jensen RV, Allan AC, Michael TP, Setubal JC, Celton JM, Rees DJG, Williams KP, Holt SH, Rojas JJR, Chatterjee M, Liu B, Silva H, Meisel L, Adato A, Filichkin SA, Troglio M, Viola R, Ashman TL, Wang H, Dharmawardhana P, Elser J, Raja R, Priest HD, Bryant DW, Fox SE, Givan SA, Wilhelm LJ, Naithani S, Christoffels A, Salama DY, Carter J, Girona EL, Zdepski A, Wang W, Kerstetter RA, Schwab W, Korban SS, Davik J, Monfort A, Denoyes-Rothan B, Arus P, Mittler R, Flinn B, Aharoni A, Bennetzen JL, Salzberg SL, Dickerman AW, Velasco R, Borodovsky M, Veilleux RE, Folta KM.** 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature Genetics **43**, 109–116.

**Sieburth LE, Lee D-K.** 2010. BYPASS1: How a Tiny Mutant Tells a Big Story about Root-to-shoot Signaling. Journal of Integrative Plant Biology **52**, 77–85.

**Sieciechowicz, KA, Ireland RJ, Kenneth WJ.** 1985. Diurnal variation of asparaginase in developing Pea leaves. Plant Physiology **77**, 506–508.

**Sieciechowicz, KA, Joy KW, Ireland RJ.** 1988a. The metabolism of asparagine in plants. Phytochemistry **27**, 663–671.

**Sieciechowicz, KA, Joy KW, Ireland RJ.** 1988b. Diurnal changes in asparaginase activity in pea leaves I. The requirement for light for increased activity. Journal of experimental botany **39**, 695–706.

**Silvente S, Reddy PM, Khandual S, Blanco L, Alvarado-Affantranger X, Sanchez F, Lara-Flores M.** 2008. Evidence for sugar signalling in the regulation of asparagine synthetase gene expressed in *Phaseolus vulgaris* roots and nodules. Journal of Experimental Botany **59**, 1279–1294.

**Skokut TA, Varner JE, Schaefer J, Stejskal EO, McKay RA.** 1982. <sup>15</sup>N NMR determination of asparagine and glutamine nitrogen utilization for synthesis of storage protein in developing cotyledons of soybean in culture. Plant Physiology **69**, 308–313.

**Smirnoff N, Todd P, Stewart GR.** 1984. The occurrence of nitrate reduction in the leaves of woody plants. Annals of Botany **54**, 363–374.

**Snow R.** 1925. The correlative inhibition of the growth of axillary buds. Annals of Botany **39**, 841–859.

- Solfanelli C, Poggi A, Loreti E, Alpi A, Perata P.** 2006. Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **140**, 637–646.
- Spiller M, Berger RG, Debener T.** 2010. Genetic dissection of scent metabolic profiles in diploid rose populations. *Theoretical and applied genetics* **120**, 1461–1471.
- Staswick PE.** 1994. Storage proteins of vegetative plant tissues. *Annual review of plant biology* **45**, 303–322.
- Stephani RA, Meister A.** 1971. Structure of the dimeric  $\alpha$ -keto acid analogue of asparagine. *Journal of Biological Chemistry* **246**, 7115–7118.
- Stephens DW, Millard P, Turnbull MH, Whitehead D.** 2001. The influence of nitrogen supply on growth and internal recycling of nitrogen in young *Nothofagus fusca* trees. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**, 249–255.
- Stirnberg P, van De Sande K, Leyser HO.** 2002. *MAX1* and *MAX2* control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Development* **129**, 1131–1141.
- Sugden C, Donaghy PG, Halford NG, Hardie DG.** 1999. Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase *in vitro*. *Plant Physiology* **120**, 257–274.
- Sulieman S, Tran L-SP.** 2013. Asparagine: an amide of particular distinction in the regulation of symbiotic nitrogen fixation of legumes. *Critical Reviews in Biotechnology* **33**, 309–327.
- Sun H, Li J, Song W, Tao J, Huang S, Chen S, Hou M, Xu G, Zhang Y.** 2015. Nitric oxide generated by nitrate reductase increases nitrogen uptake capacity by inducing lateral root formation and inorganic nitrogen uptake under partial nitrate nutrition in rice. *Journal of Experimental Botany* **66**, 2449–2459.
- Suzuki A, Rioual S, Lemarchand S, Godfroy N, Roux Y, Boutin J, Rothstein SJ.** 2001. Regulation by light and metabolites of ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize. *Physiol Plant* **112**, 524–530.
- Ta TC, Joy KW, Ireland RJ.** 1984. Amino acid metabolism in pea leaves. *Plant Physiology* **74**, 822–826.
- Tagliavini M, Millard P, Quartieri M.** 1998. Storage of foliar-absorbed nitrogen and remobilization for spring growth in young nectarine (*Prunus persica* var. *nectarina*) trees. *Tree physiology* **18**, 203–207.
- Tagliavini M, Millard P, Quartieri M, Marangoni B.** 1999. Timing of nitrogen uptake affects winter storage and spring remobilisation of nitrogen in nectarine (*Prunus persica* var. *nectarina*) trees. *Plant and Soil* **211**, 149–153.
- Takei K, Sakakibara H, Taniguchi M, Sugiyama T.** 2001. Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant and Cell Physiology* **42**, 85–93.

- Takei K, Takahashi T, Sugiyama T, Yamaya T, Sakakibara H.** 2002. Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin. *Journal of Experimental Botany* **53**, 971–977.
- Takei K, Ueda N, Aoki K, Kuromori T, Hirayama T, Shinozaki K, Yamaya T, Sakakibara H.** 2004a. AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **45**, 1053–1062.
- Takei K, Yamaya, Tomoyuki, Sakakibara H.** 2004b. *Arabidopsis CYP735A1* and *CYP735A2* encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-Zeatin. *The journal of biological chemistry* **279**, 41866–41872.
- Tanaka M, Takei K, Kojima M, Sakakibara H, Mori H.** 2006. Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *The Plant Journal* **45**, 1028–1036.
- Tanaka O, Yamamoto T, Nakayama Y, Ozaki T, Takeba G.** 1991. Flowering induced by nitrogen deficiency in *Lemna paucicostata*. *Plant and cell physiology* **32**, 1173–1177.
- Tang G-Q, Lüscher M, Sturm A.** 1999. Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning. *The Plant Cell* **11**, 177–189.
- Taniguchi M, Kiba T, Sakakibara H, Ueguchi C, Mizuno T, Sugiyama T.** 1998. Expression of *Arabidopsis* response regulator homologs is induced by cytokinins and nitrate. *FEBS letters* **429**, 259–262.
- Tarancón C, González-Grandío E, Oliveros JC, Nicolas M, Cubas P.** 2017. A conserved carbon starvation response underlies bud dormancy in woody and herbaceous species. *Frontiers in Plant Science* **8**, 1–21.
- 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, Rentsch D.** 2010. Uptake and partitioning of amino acids and peptides. *Molecular Plant* **3**, 997–1011.
- Teichmann T, Muhr M.** 2015. Shaping plant architecture. *Frontiers in Plant Science* **6**, 1–18.
- Tetyuk O, Benning UF, Hoffmann-Benning S.** 2013. Collection and analysis of *Arabidopsis* phloem exudates using the EDTA-facilitated method. *Journal of Visualized Experiments* **80**, 1–11.
- Teyssier E, Bernacchia G, Maury S, How Kit A, Stammitti-Bert L, Rolin D, Gallusci P.** 2008. Tissue dependent variations of DNA methylation and endoreduplication levels during tomato fruit development and ripening. *Planta* **228**, 391–399.
- Thitithanakul S.** 2013. Effect of nitrogen supply before bud break on early development of the young hybrid poplar. *Université Blaise Pascal*, 191.

- Thitithanakul S, Pétel G, Chalot M, Beaujard F.** 2012. Supplying nitrate before bud break induces pronounced changes in nitrogen nutrition and growth of young poplars. *Functional Plant Biology* **39**, 795–803.
- Tischner R, Hüttermann A.** 1980. Regulation of glutamine synthetase by light and during nitrogen deficiency in synchronous *Chlorella sorokiniana*. *Plant Physiology* **66**, 805–808.
- Trap-Gentil M-V, Hebrard C, Lafon-Placette C, Delaunay A, Hagege D, Joseph C, Brignolas F, Lefebvre M, Barnes S, Maury S.** 2011. Time course and amplitude of DNA methylation in the shoot apical meristem are critical points for bolting induction in sugar beet and bolting tolerance between genotypes. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2585–2597.
- Tromp J, Ovaas JC.** 1971. Phloem translocation of storage nitrogen in apple. *Physiologia Plantarum* **25**, 407–413.
- Tromp J, Ovaas JC.** 1973. Spring mobilization of protein nitrogen in apple bark. *Physiologia plantarum* **29**, 1–5.
- Tromp J, Ovaas JC.** 1979. Uptake and distribution of nitrogen in young apple trees after application of nitrate or ammonium, with special reference to asparagine and arginine. *Physiologia Plantarum* **45**, 23–28.
- Tsai F-Y, Coruzzi GM.** 1990. Dark-induced and organ-specific expression of two asparagine synthetase genes in *Pisum sativum*. *The EMBO journal* **9**, 323–332.
- Tsai F-Y, Coruzzi G.** 1991. Light represses transcription of asparagine synthetase genes in photosynthetic and nonphotosynthetic organs of plants. *Molecular and cellular biology* **11**, 4966–4972.
- Turner GW, Cuthbertson DJ, Voo SS, Settles ML, Grimes HD, Lange BM.** 2012. Experimental sink removal induces stress responses, including shifts in amino acid and phenylpropanoid metabolism, in soybean leaves. *Planta* **235**, 939–954.
- Tyzio R, Cossart R, Khalilov I, Minlebaev M, Hübner CA, Represa A, Ben-Ari Y, Khazipov R.** 2006. Maternal oxytocin triggers a transient inhibitory switch in GABA signaling in the fetal brain during delivery. *Science* **314**, 1788–1792.
- Unterholzner SJ, Rozhon W, Papacek M, Ciomas J, Lange T, Kugler KG, Mayer KF, Sieberer T, Poppenberger B.** 2015. Brassinosteroids are master regulators of gibberellin biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **27**, 2261–2272.
- Van den Ende W.** 2014. Sugars take a central position in plant growth, development and, stress responses. A focus on apical dominance. *Frontiers in Plant Science* **5**, 1-3.
- Van den Ende W, El-ESawe SK.** 2014. Sucrose signaling pathways leading to fructan and anthocyanin accumulation: A dual function in abiotic and biotic stress responses? *Environmental and Experimental Botany* **108**, 4–13.
- Van Norman JM, Frederick RL, Sieburth LE.** 2004. *BYPASS1* negatively regulates a root-derived signal that controls plant architecture. *Current Biology* **14**, 1739–1746.

- Van Norman JM, Murphy C, Sieburth LE.** 2011. *BYPASS1*: synthesis of the mobile root-derived signal requires active root growth and arrests early leaf development. *BMC Plant Biology* **11**, 1–10.
- Vian A, Stankovic B, Davies E.** 2015. Signalomics: diversity and methods of analysis of systemic signals in plants. *PlantOmics: The Omics of Plant Science*, ed. D. Barh, M.S. Khan and E. Davies, 459-489.
- Viola R, Pelloux J, Van Der Ploeg A, Gillespie T, Marquis N, Roberts AG, Hancock RD.** 2007. Symplastic connection is required for bud outgrowth following dormancy in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Plant, Cell & Environment* **30**, 973–983.
- Viola IL, Uberti Manassero NG, Ripoll R, Gonzalez DH.** 2011. The *Arabidopsis* class I TCP transcription factor *AtTCP11* is a developmental regulator with distinct DNA-binding properties due to the presence of a threonine residue at position 15 of the TCP domain. *Biochemical Journal* **435**, 143–155.
- Visser RD, Vianden H, Schnyder H.** 1997. Kinetics and relative significance of remobilized and current C and N incorporation in leaf and root growth zones of *Lolium perenne* after defoliation: assessment by <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N steady-state labelling. *Plant, Cell & Environment* **20**, 37–46.
- Vizoso S, Gerant D, Guehl JM, Joffre R, Chalot M, Gross P, Maillard P.** 2008. Do elevation of CO<sub>2</sub> concentration and nitrogen fertilization alter storage and remobilization of carbon and nitrogen in pedunculate oak saplings? *Tree Physiology* **28**, 1729–1739.
- Von Wittgenstein NJ, Le CH, Hawkins BJ, Ehling J.** 2014. Evolutionary classification of ammonium, nitrate, and peptide transporters in land plants. *BMC evolutionary biology* **14**, 1–11.
- Vukosavljev M, Arens P, Voorrips RE, van't Westende WPC, Esselink G, Bourke PM, Cox P, van de Weg WE, Visser RGF, Maliepaard C, Smulders MJM.** 2016. High-density SNP-based genetic maps for the parents of an outcrossed and a selfed tetraploid garden rose cross, inferred from admixed progeny using the 68k rose SNP array. *Horticulture Research* **3**, 16052–16060.
- Vuylsteker C, Huss B, Rambour S.** 1997. Nitrate reductase activity in chicory roots following excision. *Journal of experimental botany* **48**, 59–65.
- Wagner D, Meyerowitz EM.** 2002. SPLAYED, a novel SWI/SNF ATPase homolog, controls reproductive development in *Arabidopsis*. *Current Biology* **12**, 85–94.
- Walker RP, Chen Z-H, Johnson KE, Famiani F, Tecsí L, Leegood RC.** 2001. Using immunohistochemistry to study plant metabolism: the examples of its use in the localization of amino acids in plant tissues, and of phosphoenolpyruvate carboxykinase and its possible role in pH regulation. *Journal of Experimental Botany* **52**, 565–576.
- Walker RP, Chen Z-H, Tecsí LI, Famiani F, Lea PJ, Leegood RC.** 1999. Phosphoenolpyruvate carboxykinase plays a role in interactions of carbon and nitrogen metabolism during grape seed development. *Planta* **210**, 9–18.

- Walker RP, Paoletti A, Leegood RC, Famiani F.** 2016. Phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) in the flesh of fruits. *Plant Physiology and Biochemistry* **108**, 323–327.
- Wang W-H, Köhler B, Cao F-Q, Liu L-H.** 2008. Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants. *Plant science* **175**, 467–477.
- Wang X, Chen J, Xie Z, Liu S, Nolan T, Ye H, Zhang M, Guo H, Schnable PS, Li Z.** 2014. Histone lysine methyltransferase SDG8 is involved in brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant* **7**, 1303–1315.
- Wang SY, Jiao HJ, Faust M.** 1991. Changes in ascorbate, glutathione, and related enzyme activities during thidiazuron-induced bud break of apple. *Physiologia Plantarum* **82**, 231–236.
- Wang L, Li X-R, Lian H, Ni D-A, He Y -k., Chen X-Y, Ruan Y-L.** 2010. Evidence that high activity of vacuolar invertase is required for cotton fiber and *Arabidopsis* root elongation through osmotic dependent and independent pathways, respectively. *Plant Physiology* **154**, 744–756.
- Wang L, Mai Y-X, Zhang Y-C, Luo Q, Yang H-Q.** 2010. *MicroRNA171c*-targeted *SCL6-II*, *SCL6-III*, and *SCL6-IV* genes regulate shoot branching in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **3**, 794–806.
- Wang R, Tischner R, Gutiérrez RA, Hoffman M, Xing X, Chen M, Coruzzi G, Crawford NM.** 2004. Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **136**, 2512–2522.
- Waterhouse RN, Smyth AJ, Massonneau A, Prosser IM, Clarkson DT.** 1996. Molecular cloning and characterisation of asparagine synthetase from *Lotus japonicus*: dynamics of asparagine synthesis in N-sufficient conditions. *Plant molecular biology* **30**, 883–897.
- Waters MT, Gutjahr C, Bennett T, Nelson DC.** 2017. Strigolactone signaling and evolution. *Annual Review of Plant Biology* **68**, 291–322.
- Weiland M, Mancuso S, Baluska F.** 2015. Signalling via glutamate and GLRs in *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology* **43**, 1–25.
- Will GM.** 1971. Nitrogen supply, apical dominance and branch growth in *Pinus radiata*. *Plant and Soil* **34**, 515–517.
- Wind J, Smeekens S, Hanson J.** 2010. Sucrose: Metabolite and signaling molecule. *Phytochemistry* **71**, 1610–1614.
- von Wirén N, Gazzarrini S, Gojon A, Frommer WB.** 2000. The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Current opinion in plant biology* **3**, 254–261.
- Wisniewski M, Bassett C, Arora R.** 2004. Distribution and partial characterization of seasonally expressed proteins in different aged shoots and roots of ‘Loring’ peach (*Prunus persica*). *Tree physiology* **24**, 339–345.

- Wong H-K, Chan H-K, Coruzzi GM, Lam H-M.** 2004. Correlation of *ASN2* gene expression with ammonium metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **134**, 332–338.
- Xia K, Wang R, Ou X, Fang Z, Tian C, Duan J, Wang Y, Zhang M.** 2012. *OsTIR1* and *OsAFB2* downregulation via *OsmiR393* overexpression leads to more tillers, early flowering and less tolerance to salt and drought in rice. *PLoS ONE* **7**, 1–10.
- Xiang Y, Huang C-H, Hu Y, Wen J, Li S, Yi T, Chen H, Xiang J, Ma H.** 2017. Evolution of *Rosaceae* fruit types based on nuclear phylogeny in the context of geological times and genome duplication. *Molecular biology and evolution* **34**, 262–281.
- Xu G, Fan X, Miller AJ.** 2012. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual review of plant biology* **63**, 153–182.
- Xu J, Zha M, Li Y, Ding Y, Chen L, Ding C, Wang S.** 2015. The interaction between nitrogen availability and auxin, cytokinin, and strigolactone in the control of shoot branching in rice (*Oryza sativa L.*). *Plant Cell Reports* **34**, 1647–1662.
- Yabuki Y, Ohashi M, Imagawa F, Ishiyama K, Beier MP, Konishi N, Umetsu-Ohashi T, Hayakawa T, Yamaya T, Kojima S.** 2017. A temporal and spatial contribution of asparaginase to asparagine catabolism during development of rice grains. *Rice* **10**, 1–10.
- Yaginuma H, Hirakawa Y, Kondo Y, Ohashi-Ito K, Fukuda H.** 2011. A novel function of TDIF-Related peptides: promotion of axillary bud formation. *Plant and Cell Physiology* **52**, 1354–1364.
- Yaish MWF, Peng M, Rothstein SJ.** 2009. *AtMBD9* modulates *Arabidopsis* development through the dual epigenetic pathways of DNA methylation and histone acetylation. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **59**, 123–135.
- Yamashita T.** 1986. Mobilization of carbohydrates, amino acids and adenine nucleotides in hardwood stems during regrowth after partial shoot harvest in mulberry trees (*Morus alba L.*). *Annals of botany* **57**, 237–244.
- Yamashita T.** 1990. Variations in amounts of carbohydrates, amino acids and adenine nucleotides in mulberry tree (*Morus alba L.*) stems during transitional phases of growth. *Tree physiology* **6**, 191–200.
- Yan D, Tatematsu K, Nakabayashi K, Endo A, Okamoto M, Nambara E.** 2015. A Comparison of Transcriptomes Between Germinating Seeds and Growing Axillary Buds of *Arabidopsis*. In: Anderson JV, ed. *Advances in Plant Dormancy*. Springer International Publishing, 223–233.
- Yang L, Conway SR, Poethig RS.** 2011. Vegetative phase change is mediated by a leaf-derived signal that represses the transcription of *miR156*. *Development* **138**, 245–249.
- Yang Z, Rogers LM, Song Y, Guo W, Kolattukudy PE.** 2005. Homoserine and asparagine are host signals that trigger *in planta* expression of a pathogenesis gene in *Nectria haematococca*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 4197–4202.

- Young NF, Ferguson BJ, Antoniadi I, Bennett MH, Beveridge CA, Turnbull CGN.** 2014. Conditional auxin response and differential cytokinin profiles in shoot branching mutants. *Plant Physiology* **165**, 1723–1736.
- Yu S, Cao L, Zhou C-M, Zhang T-Q, Lian H, Sun Y, Wu J, Huang J, Wang G, Wang J-W.** 2013. Sugar is an endogenous cue for juvenile-to-adult phase transition in plants. *Elife* **2**, 1–17.
- Yu S, Lian H, Wang J-W.** 2015. Plant developmental transitions: the role of microRNAs and sugars. *Current Opinion in Plant Biology* **27**, 1–7.
- Yuan C, Xi L, Kou Y, Zhao Y, Zhao L.** 2015. Current perspectives on shoot branching regulation. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering* **2**, 38–52.
- Zhang J, Wu Y, Li D, Wang G, Li X, Xia Y.** 2015. Transcriptomic Analysis of the Underground Renewal buds during dormancy transition and release in ‘Hangbaishao’ Peony (*Paeonia lactiflora*). *PLoS ONE* **10**, 1–30.
- Zhang L, Tan Q, Lee R, Trethewey A, Lee Y-H, Tegeder M.** 2010. Altered xylem-phloem transfer of amino acids affects metabolism and leads to increased seed yield and oil content in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* **22**, 3603–3620.
- Zhang M, Xu C, Von Wettstein D, Liu B.** 2011. Tissue-specific differences in cytosine methylation and their association with differential gene expression in *Sorghum*. *Plant Physiology* **156**, 1955–1966.
- Zhang N.** 2015. Epigenetic modulation of DNA methylation by nutrition and its mechanisms in animals. *Animal Nutrition* **1**, 144–151.
- Zhang Y, Primavesi LF, Jhurrea D, Andralojc PJ, Mitchell RAC, Powers SJ, Schluempmann H, Delatte T, Wingler A, Paul MJ.** 2009. Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiology* **149**, 1860–1871.
- Zhao D, Reddy KR, Kakani VG, Reddy VR.** 2005. Nitrogen deficiency effects on plant growth, leaf photosynthesis, and hyperspectral reflectance properties of sorghum. *European Journal of Agronomy* **22**, 391–403.
- Zhao W, Yang X, Yu H, Jiang W, Sun N, Liu X, Liu X, Zhang X, Wang Y, Gu X.** 2015. RNA-Seq-Based transcriptome profiling of early nitrogen deficiency response in cucumber seedlings provides new insight into the putative nitrogen regulatory network. *Plant and Cell Physiology* **56**, 455–467.
- Zheng J, Xiao X, Zhang Q, Yu M, Xu J, Wang Z, Qi C, Wang T.** 2015. Maternal and post-weaning high-fat, high-sucrose diet modulates glucose homeostasis and hypothalamic *POMC* promoter methylation in mouse offspring. *Metab Brain Dis* **30**, 1129–1137.
- Zhu B, Coleman GD.** 2001. Phytochrome-mediated photoperiod perception, shoot growth, glutamine, calcium, and protein phosphorylation influence the activity of the poplar bark storage protein gene promoter (bspA). *Plant Physiology* **126**, 342–351.

- Zieliński J, Petrova A, Tan K.** 2004. Taxonomic status of the roses (*Rosa*) described by S.G. Dimitrov from Bulgaria. *Annals of Botany* **41**, 449–451.
- Zieslin N, Halevy AH.** 1976. Components of axillary bud inhibition in rose plants. I. The effect of different plant parts (correlative inhibition). *Botanical Gazette* **137**, 291–296.
- Zurek DM, Rayle DL, McMorris TC, Clouse SD.** 1994. Investigation of gene expression, growth kinetics, and wall extensibility during brassinosteroid-regulated stem elongation. *Plant Physiology* **104**, 505–513.

# ANNEXES des résultats de RNAseq

Annexe I : liste des séquences exprimées de manière différente (nombre de reads) en réponse au nitrate en présence de saccharose dans la catégorie « Transcription ».

Annotations chez le rosier	+S+N	+S-N	Fonction de la séquence	Sous-catégories
Rosa_BI_20160929_042514	221	379	CCG-binding 1-like	Modification de la chromatine
Rosa_BI_20160929_075189	44	16	elongator complex 5	Modification de la chromatine
Rosa_BI_20160929_067977	29	57	bromodomain-containing 9-like isoform X1	Modification de la chromatine
Rosa_BI_20160929_019594	0	8	PAX3- and PAX7-binding 1	Modification de la chromatine
Rosa_BI_20160929_068415	4	19	DRM-type cytosine DNA-methyltransferase	Modification de la chromatine
Rosa_BI_20160929_061348	13	36	ATX2 : Histone-lysine N-methyltransferase	Modification de la chromatine
Rosa_BI_20160929_004547	17	42	ATX3 : Histone-lysine N-methyltransferase	Modification de la chromatine
Rosa_BI_20160929_011047	35	82	lysine-specific demethylase JMJ25-like	Modification de la chromatine
Rosa_BI_20160929_009611	79	152	lysine-specific demethylase JMJ15-like isoform X1	Modification de la chromatine
Rosa_BI_20160929_052806	68	116	probable lysine-specific demethylase JMJ14 isoform X1	Modification de la chromatine
Rosa_BI_20160929_058260	46	84	SUVH1 : Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-9	Modification de la chromatine
Rosa_BI_20160929_005613	7	34	chromatin structure-remodeling complex SYD isoform X4	Modification de la chromatine
Rosa_BI_20160929_009655	55	94	chromatin structure-remodeling complex SYD isoform X2	Modification de la chromatine
Rosa_BI_20160929_046024	11	34	sister chromatid cohesion PDS5 homolog A	Modification de la chromatine
Rosa_BI_20160929_009449	106	61	Histone H3.3	Modification de la chromatine
Rosa_BI_20160929_023362	88	51	Histone H2B	Modification de la chromatine
Rosa_BI_20160929_007998	45	20	DNA polymerase alpha subunit B	Processus généraux
Rosa_BI_20160929_048565	88	44	DNA topoisomerase 2	Processus généraux
Rosa_BI_20160929_012574	158	96	Alba DNA RNA-binding	Processus généraux
Rosa_BI_20160929_008355	90	54	Peter Pan-like protein	Processus généraux
Rosa_BI_20160929_016563	9	0	abnormal spindle-like microcephaly-associated homolog	Processus généraux
Rosa_BI_20160929_000202	30	58	centromere kinetochore zw10 homolog	Processus généraux
Rosa_BI_20160929_055664	103	199	MEI2-like 2 isoform X1	Processus généraux
Rosa_BI_20160929_066562	134	74	ATP-dependent RNA helicase DBP3-like	Processus généraux
Rosa_BI_20160929_022663	83	151	RNA-dependent RNA polymerase 1 isoform X1	Processus généraux
Rosa_BI_20160929_007194	18	4	exonuclease chloroplastic	Processus généraux
Rosa_BI_20160929_041831	8	25	PHD finger At1g33420-like	Processus généraux
Rosa_BI_20160929_002214	36	83	mediator of RNA polymerase II Transcription subunit 15a isoform X1	Processus généraux
Rosa_BI_20160929_039853	9	26	nuclear pore complex NUP205	Processus généraux
Rosa_BI_20160929_068092	30	12	Tafazzin	Processus généraux
Rosa_BI_20160929_051239	458	226	uroporphyrinogen-III C-methyltransferase	Processus généraux
Rosa_BI_20160929_011397	27	53	gag-pol poly	Processus généraux
Rosa_BI_20160929_054785	172	320	bifunctional nuclease 1-like	Processus généraux
Rosa_BI_20160929_012864	183	304	bifunctional nuclease 1-like	Processus généraux
Rosa_BI_20160929_007082	31	12	translin-associated X	Processus généraux
Rosa_BI_20160929_060062	104	170	binding partner of ACD11 1	Processus généraux
Rosa_BI_20160929_023841	66	36	PLASTID TranscriptionALLY ACTIVE 10	Processus généraux

Rosa_BI_20160929_023104	102	60	exosome complex component CSL4	Processus généraux
Rosa_BI_20160929_030323	5	20	cellular nucleic acid-binding homolog	Processus généraux
Rosa_BI_20160929_042580	88	51	Pre-mRNA cleavage complex 2 isoform 2	Processus généraux
Rosa_BI_20160929_039317	2	14	polyadenylate-binding 3-like isoform X2	Processus généraux
Rosa_BI_20160929_024304	4	18	enhancer of mRNA-decapping 4	Processus généraux
Rosa_BI_20160929_000888	39	17	CRM-domain containing factor chloroplastic mitochondrial	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_026196	16	3	U3 small nucleolar RNA-associated 21 homolog	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_004062	99	60	ribonucleoside-diphosphate reductase small chain	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_013370	12	33	nucleolin 2	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_028910	8	0	ribosomal S19 (chloroplast)	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_029362	1	12	39S ribosomal mitochondrial	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_058127	21	6	ribosomal S3 (chloroplast)	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_044672	43	16	50S ribosomal chloroplastic	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_015475	310	118	40S ribosomal S20-2-like	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_047893	29	11	50S ribosomal L30	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_067100	39	15	ubiquitin-40S ribosomal S27a	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_018067	36	15	ribosomal RNA small subunit methyltransferase F	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_057051	72	36	ribosome biogenesis wdr12	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_051121	178	93	60S ribosomal L3-2 isoform X1	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_006877	937	514	60S acidic ribosomal P0	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_059249	83	46	ribosomal RNA processing 1 homolog	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_045649	118	66	60S ribosomal L13a-4	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_017069	454	262	40S ribosomal S30	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_045265	109	63	ribosome production factor 2 homolog	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_052471	117	70	ribosomal RNA small subunit methyltransferase nep-1	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_025182	683	409	60S ribosomal L17-2	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_020249	1126	680	60S ribosomal L10	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_014201	293	177	60S ribosomal L37a-2	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_039000	930	562	60S ribosomal L23	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_065825	179	109	50S ribosomal L3- chloroplastic	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_056615	272	166	60S ribosomal L34	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_021056	175	107	40S ribosomal S24-1-like	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_019533	518	318	60S ribosomal L14-1-like	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_006098	392	241	60S ribosomal L19-2	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_037153	2	14	endoribonuclease Dicer homolog 3a	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_023617	58	22	H ACA ribonucleo complex subunit 1 1	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_008803	49	20	ribonucleoside-diphosphate reductase small chain A-like	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_057844	44	18	probable ADP-ribosylation factor GTPase-activating AGD11	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_060279	34	14	29 kDa ribonucleo chloroplastic	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_065179	60	32	ribonucleoside-diphosphate reductase small chain A	Synthèse d'ARN ribosomique
Rosa_BI_20160929_059456	441	267	29 kDa ribonucleo chloroplastic-like	Synthèse d'ARN ribosomique

Rosa_BI_20160929_007994	57	30	tesmin TSO1-like CXC 5	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_057532	18	4	B3 domain-containing REM5-like	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_042726	35	12	Protein TR11	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_047435	31	11	GRF1-interacting factor 3-like	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_070147	27	54	NLP5-like isoform X2	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_048196	22	47	ELF4-LIKE 4-like	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_031052	8	0	Transcription factor bHLH35	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_018326	0	8	Transcription repressor MYB6-like	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_004617	3	16	Transcription repressor OFP4	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_022130	24	6	Transcription factor -like	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_054310	20	67	Transcription factor bHLH130-like	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_005427	11	33	Transcription factor bHLH68-like isoform X4	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_019248	12	31	Transcription initiation factor IIF subunit beta-like	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_044200	13	33	Transcription elongation factor spt5 isoform X4	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_031836	40	16	Trihelix Transcription factor GT-2	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_007398	30	12	Transcription factor IIIA-like isoform X2	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_039159	32	13	RNA polymerase II Transcriptional coactivator KIWI-like	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_054311	30	71	Transcription factor bHLH130-like	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_049776	37	16	Transcription factor bHLH62	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_013516	18	41	Transcription initiation factor TFIID subunit 2	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_054309	36	80	Transcription factor bHLH130-like	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_073711	20	43	trihelix Transcription factor GTL1 isoform X2	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_012456	48	24	Transcription initiation factor TFIID subunit 13	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_007616	176	91	probable Transcription factor GLK2	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_018063	181	350	bHLH Transcriptional factor AN1 homolog	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_056230	67	35	GATA Transcription factor 15-like	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_020371	44	83	Transcription factor TT2-like	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_053969	783	417	Transcription factor bHLH51	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_060132	82	44	Transcription factor UNE12	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_073714	39	69	Transcription factor MYC2	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_014310	43	74	trihelix Transcription factor GTL1 isoform X2	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_035156	348	210	Transcription factor bHLH94-like	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_008464	12	1	zinc finger MYM-type 1-like	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_008860	160	338	zinc finger CCCH domain-containing 20	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_063520	67	134	zinc finger CCCH domain-containing 20	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_005787	49	95	dof zinc finger -like	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_066889	82	44	zinc finger CCCH domain-containing 18 isoform X2	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_053679	58	105	zinc finger CCCH domain-containing ZFN-like	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_025154	110	184	zinc finger CCCH domain-containing ZFN-like	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_068365	54	90	zinc finger CCCH domain-containing 6-like	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_045495	219	425	myb-related 308-like	Facteurs de transcription

Rosa_BI_20160929_045494	317	534	myb-related 308-like	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_073519	43	75	scarecrow 33	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_036421	11	29	FAR1-RELATED SEQUENCE 5-like	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_002275	14	33	FAR1-RELATED SEQUENCE 5-like	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_054178	87	147	CCR4-associated factor 1 homolog 7	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_003933	53	22	WUSCHEL-related homeobox 4	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_024415	62	124	WUSCHEL ortholog	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_008187	27	52	WUS	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_011036	36	69	WUSCHEL ortholog	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_009353	68	130	Wuschela	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_039377	3	18	TATA-binding -associated factor BTAF1	Facteurs de transcription
Rosa_BI_20160929_006244	14	33	FIP1[V]-like protein	Traduction
Rosa_BI_20160929_015285	19	46	RNA-binding MEX3B-like isoform X1	Traduction
Rosa_BI_20160929_067503	11	0	RNA pseudouridine synthase 5	Traduction
Rosa_BI_20160929_006288	0	8	gag-pol poly	Traduction
Rosa_BI_20160929_011332	3	21	gag-pol poly	Traduction
Rosa_BI_20160929_046176	25	55	translation factor SUI1 homolog	Traduction
Rosa_BI_20160929_013153	3	16	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L-like	Traduction
Rosa_BI_20160929_072060	78	45	eukaryotic translation initiation factor 2A	Traduction
Rosa_BI_20160929_050874	62	29	replication A 32 kDa subunit A-like	Réplication et réparation de l'ADN
Rosa_BI_20160929_013106	10	0	nuA4 complex subunit EAF3 homolog	Réplication et réparation de l'ADN
Rosa_BI_20160929_070548	27	9	double-strand break repair MRE11	Réplication et réparation de l'ADN
Rosa_BI_20160929_015252	13	42	nudix hydrolase 8 isoform X1	Réplication et réparation de l'ADN
Rosa_BI_20160929_020893	78	42	DNA replication licensing factor MCM2	Réplication et réparation de l'ADN
Rosa_BI_20160929_018694	33	12	DNA replication licensing factor MCM6	Réplication et réparation de l'ADN
Rosa_BI_20160929_008196	35	15	DNA replication licensing factor MCM4	Réplication et réparation de l'ADN

Annexe II : liste des séquences exprimées de manière différente (nombre de reads) en réponse au nitrate en présence de saccharose dans la catégorie « Signalisation ».

Annotations chez le rosier	+S+N	+S-N	Fonction de la séquence	Sous-catégories	
Rosa_BI_20160929_058810	315	189	PIN1 : auxin efflux carrier component 1	Régulateurs de croissance	Auxine
Rosa_BI_20160929_075000	12	1	amidase 1		
Rosa_BI_20160929_015298	28	58	IRK-interacting -like auxin-dependent (receptor-like kinase)		
Rosa_BI_20160929_033125	54	22	indole-3-acetic acid-induced ARG2-like		
Rosa_BI_20160929_044570	1653	773	indole-3-acetic acid-induced ARG2-like		
Rosa_BI_20160929_005698	115	199	auxin-induced 6B : ARG7 family		
Rosa_BI_20160929_002575	78	169	zeaxanthin chloroplastic-like		Acide abscissique
Rosa_BI_20160929_059544	80	22	CYP707A4 abscisic acid 8 -hydroxylase 4		
Rosa_BI_20160929_020243	0	11	Transcription factor TCP11		
Rosa_BI_20160929_035840	24	3	WRKY20 Transcription partial		
Rosa_BI_20160929_070172	74	40	ninja-family AFP3-like		
Rosa_BI_20160929_009265	11	41	abscisic acid receptor PYL4-like		
Rosa_BI_20160929_055770	211	401	Protein BPS1, chloroplastic-like		Caroténoïdes
Rosa_BI_20160929_012093	30	10	ethylene-responsive Transcription factor CRF2		Ethylène
Rosa_BI_20160929_050298	105	45	ethylene-responsive Transcription factor ERF118-like		
Rosa_BI_20160929_011529	24	49	APETALA2 ethylene responsive element binding partial		
Rosa_BI_20160929_050299	106	57	ethylene-responsive Transcription factor ERF118-like		
Rosa_BI_20160929_025570	93	154	ethylene-responsive Transcription factor ERF110-like isoform X1		
Rosa_BI_20160929_008908	78	129	ethylene-responsive Transcription factor ERF114-like		
Rosa_BI_20160929_016045	36	109	brassinosteroid-regulated BRU1-like		Brassinostéroïdes
Rosa_BI_20160929_052108	33	13	two-component response regulator ARR1-like	Cytokinines	
Rosa_BI_20160929_057553	36	68	two-component response regulator ARR1-like		
Rosa_BI_20160929_005350	149	78	IPT3 : adenylate isopentenyltransferase chloroplastic		
Rosa_BI_20160929_053586	114	46	gibberellin 20 oxidase 1		
Rosa_BI_20160929_021029	0	9	ent-kaur-16-ene synthase chloroplastic-like	Gibbérellines	
Rosa_BI_20160929_002924	7	23	MLO 4		
Rosa_BI_20160929_071733	8	27	ELMO domain-containing A-like		
Rosa_BI_20160929_056006	71	30	transducin family		
Rosa_BI_20160929_020337	62	32	ras GTPase-activating -binding 2-like		
Rosa_BI_20160929_063354	22	6	TBC1 domain family member 15-like isoform X2		
Rosa_BI_20160929_006552	18	40	rho GTPase-activating 1		
Rosa_BI_20160929_008283	161	311	GPN-loop GTPase 3-like		
Rosa_BI_20160929_008284	147	256	GPN-loop GTPase 3-like		
Rosa_BI_20160929_008282	110	231	GPN-loop GTPase 3-like		
Rosa_BI_20160929_074185	12	33	titin isoform X1		
Rosa_BI_20160929_035707	0	22	L-type lectin-domain containing receptor kinase -like		Kinases
Rosa_BI_20160929_061189	8	0	uridine-cytidine kinase C		

Rosa_BI_20160929_064798	3	17	receptor kinase At3g47110 isoform X1
Rosa_BI_20160929_076040	18	4	mitogen-activated kinase kinase kinase 1-like
Rosa_BI_20160929_074732	19	5	mitogen-activated kinase kinase kinase YODA-like isoform X1
Rosa_BI_20160929_074730	7	24	mitogen-activated kinase kinase kinase YODA-like isoform X1
Rosa_BI_20160929_077232	18	52	receptor kinase HSL1
Rosa_BI_20160929_008262	14	37	dolichol kinase EVAN
Rosa_BI_20160929_013865	26	64	cyclin-dependent kinase inhibitor SMR2-like
Rosa_BI_20160929_057802	25	55	glycerol kinase-like
Rosa_BI_20160929_015307	54	113	L-type lectin-domain containing receptor kinase
Rosa_BI_20160929_010579	220	445	CBL-interacting kinase 23-like
Rosa_BI_20160929_039187	33	65	MOB kinase activator-like 1 isoform X2
Rosa_BI_20160929_064801	28	54	receptor kinase At3g47110
Rosa_BI_20160929_007991	64	123	probable receptor kinase At1g67000
Rosa_BI_20160929_064799	35	67	receptor kinase At3g47110
Rosa_BI_20160929_003845	39	73	probable receptor kinase At1g67000 isoform X1
Rosa_BI_20160929_053812	89	49	uridine kinase 3
Rosa_BI_20160929_015361	44	76	receptor kinase HERK 1
Rosa_BI_20160929_008726	54	90	lysM domain receptor-like kinase 4
Rosa_BI_20160929_043784	133	220	casein kinase I-like
Rosa_BI_20160929_018496	37	15	dual specificity phosphatase 12-like
Rosa_BI_20160929_010345	12	0	FHA domain-containing PS1-like
Rosa_BI_20160929_012743	13	32	serine-rich adhesin for platelets
Rosa_BI_20160929_069638	14	34	serine carboxypeptidase-like 51
Rosa_BI_20160929_009621	433	835	serine carboxypeptidase-like 13
Rosa_BI_20160929_002549	248	477	serine carboxypeptidase-like 7
Rosa_BI_20160929_045154	54	24	serine carboxypeptidase-like 13
Rosa_BI_20160929_054116	36	16	serine threonine- phosphatase 4 regulatory subunit 2
Rosa_BI_20160929_072646	13	38	probable leucine-rich repeat receptor-like serine threonine- kinase At3g14840
Rosa_BI_20160929_061055	10	27	serine carboxypeptidase-like 18
Rosa_BI_20160929_053982	15	40	leucine-rich repeat receptor-like serine threonine- kinase BAM1
Rosa_BI_20160929_068523	15	40	serine threonine- kinase AFC1
Rosa_BI_20160929_066916	16	37	probable serine threonine- kinase WNK4 isoform X1
Rosa_BI_20160929_007954	15	2	LRR receptor-like serine threonine- kinase partial
Rosa_BI_20160929_052307	56	112	probable LRR receptor-like serine threonine- kinase At1g14390
Rosa_BI_20160929_008534	48	24	LRR receptor-like serine threonine- kinase
Rosa_BI_20160929_013296	34	67	probable serine threonine- kinase At1g01540
Rosa_BI_20160929_019636	12	38	LRR receptor-like serine threonine- kinase ERL2
Rosa_BI_20160929_011438	22	49	probable leucine-rich repeat receptor-like serine threonine- kinase At3g14840
Rosa_BI_20160929_051005	17	4	G-type lectin S-receptor-like serine threonine- kinase At4g03230
Rosa_BI_20160929_058651	25	6	pentatricopeptide repeat-containing chloroplastic-like

Rosa_BI_20160929_052858	6	23	phosphatidylserine decarboxylase proenzyme mitochondrial	
Rosa_BI_20160929_057924	5	24	anthranilate N-benzoyltransferase 3-like	
Rosa_BI_20160929_012225	383	235	leucine-rich repeat receptor	
Rosa_BI_20160929_011460	29	61	receptor-like serine threonine- kinase ALE2 isoform X3	
Rosa_BI_20160929_013747	50	83	serine carboxypeptidase-like 13 isoform X2	
Rosa_BI_20160929_061668	104	61	serine--tRNA ligase	
Rosa_BI_20160929_060037	37	66	probable LRR receptor-like serine threonine- kinase At5g48740 isoform X2	
Rosa_BI_20160929_013606	281	496	CBL-interacting serine threonine- kinase 5	
Rosa_BI_20160929_054702	20	61	cytochrome P450 78A7	Cytochrome
Rosa_BI_20160929_013436	10	28	cytochrome P450 CYP72A219-like	
Rosa_BI_20160929_023218	27	70	cytochrome P450 CYP72A219-like	
Rosa_BI_20160929_001964	100	177	cytochrome P450 86A7	
Rosa_BI_20160929_007265	213	354	cytochrome P450 81E8-like	
Rosa_BI_20160929_028629	0	8	Conotoxin Superfamily SF13	
Rosa_BI_20160929_068324	11	1	Conotoxin Superfamily SF13	
Rosa_BI_20160929_040835	43	95	Conotoxin Superfamily SF13	
Rosa_BI_20160929_047088	75	34	Conotoxin Superfamily SF13	
Rosa_BI_20160929_062162	8	30	transmembrane 45B	
Rosa_BI_20160929_053904	50	24	transmembrane 9 superfamily member 5	
Rosa_BI_20160929_049376	51	94	heptahelical transmembrane 2-like isoform X2	
Rosa_BI_20160929_006420	60	113	plant intracellular Ras-group-related LRR 9-like	
Rosa_BI_20160929_047024	40	83	Calcium-binding CML31	
Rosa_BI_20160929_045713	19	43	kinesin-like calmodulin-binding	
Rosa_BI_20160929_016726	67	123	calmodulin-binding Transcription activator 4	
Rosa_BI_20160929_011248	34	62	cation calcium exchanger 1	
Rosa_BI_20160929_061488	84	147	GIGANTEA isoform X1	
Rosa_BI_20160929_052661	70	157	plasma membrane-associated cation-binding 1-like	
Rosa_BI_20160929_041699	85	41	SNF2 domain-containing CLASSY 3-like	
Rosa_BI_20160929_061301	9	27	3,5 -nucleoside bisphosphate phosphatase	
Rosa_BI_20160929_012225	383	235	leucine-rich repeat receptor	
Rosa_BI_20160929_012350	23	47	short-chain dehydrogenase TIC chloroplastic-like	
Rosa_BI_20160929_034624	67	29	signal recognition particle 9 kDa	
Rosa_BI_20160929_051407	148	269	Transcription factor MYB1R1	
Rosa_BI_20160929_005945	73	38	Signalisation	

Annexe III : liste des séquences exprimées de manière différente (nombre de reads) en réponse au nitrate en présence de saccharose dans la catégorie « Métabolisme primaire ».

Annotations chez le rosier	+S+N	+S-N	Fonction de la séquence	Sous-catégories
Rosa_BI_20160929_022487	4	38	high affinity nitrate transporter	Azote
Rosa_BI_20160929_024675	12	50	high affinity nitrate transporter	
Rosa_BI_20160929_018016	81	39	high-affinity nitrate transporter -like	
Rosa_BI_20160929_009443	80	391	high affinity nitrate transporter -like	
Rosa_BI_20160929_044021	7	28	high affinity nitrate transporter -like	
Rosa_BI_20160929_010136	237	118	low affinity nitrate transporter	
Rosa_BI_20160929_006452	501	303	low affinity nitrate transporter	
Rosa_BI_20160929_070576	173	91	low affinity nitrate transporter	
Rosa_BI_20160929_020172	29	6	low affinity nitrate transporter	
Rosa_BI_20160929_071586	82	44	chloride channel CLC-b	
Rosa_BI_20160929_048243	39	77	ammonium transporter	Azote
Rosa_BI_20160929_017345	40	74	ammonium transporter 3 member 1-like	
Rosa_BI_20160929_048244	31	71	ammonium transporter	
Rosa_BI_20160929_003433	34	76	ammonium transporter	
Rosa_BI_20160929_045967	80	132	oligopeptide transporter 7-like	Azote
Rosa_BI_20160929_045965	58	105	oligopeptide transporter 7-like	
Rosa_BI_20160929_059301	10	29	oligopeptide transporter 7	
Rosa_BI_20160929_004044	13	33	oligopeptide transporter 7	
Rosa_BI_20160929_048327	235	98	amino acid permease 3-like	
Rosa_BI_20160929_048326	194	94	amino acid permease 3-like	
Rosa_BI_20160929_010005	43	80	WAT1-related At3g28050-like	
Rosa_BI_20160929_000470	113	214	cationic amino acid transporter 5	
Rosa_BI_20160929_054784	42	20	lysine histidine transporter-like 6	
Rosa_BI_20160929_038594	198	41	asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	
Rosa_BI_20160929_008972	1415	4756	L-asparaginase 2	
Rosa_BI_20160929_014758	44	16	alanine and asparagine-rich -like	
Rosa_BI_20160929_027677	129	24	alanine and asparagine-rich -like	
Rosa_BI_20160929_096806	5	19	probable glutamate carboxypeptidase 2	Azote
Rosa_BI_20160929_052392	5460	2814	glutamate synthase 1 [NADH] chloroplastic isoform X1	
Rosa_BI_20160929_059233	584	176	glutamate dehydrogenase 2	
Rosa_BI_20160929_015736	45	18	PRA1 family F3-like	Azote
Rosa_BI_20160929_039030	172	89	pyrroline-5-carboxylate reductase	
Rosa_BI_20160929_054794	1815	990	delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase-like	
Rosa_BI_20160929_054592	56	259	proline dehydrogenase mitochondrial	
Rosa_BI_20160929_049993	787	445	kDa proline-rich	
Rosa_BI_20160929_038694	162	96	kDa proline-rich	
Rosa_BI_20160929_015433	1001	608	14 kDa proline-rich -like	

Rosa_BI_20160929_058848	53	23	carbamoyl-phosphate synthase small chloroplastic-like	Azote	Cycle de l'urée
Rosa_BI_20160929_055283	1	16	arginase mitochondrial-like	Azote	
Rosa_BI_20160929_018527	14	38	ureide permease 2-like	Azote	
Rosa_BI_20160929_045075	29	72	ureide permease 2-like	Azote	
Rosa_BI_20160929_045074	26	51	ureide permease 2-like	Azote	
Rosa_BI_20160929_039521	1611	965	glutamine synthetase leaf chloroplastic	Azote	Glutamine
Rosa_BI_20160929_067060	9	31	glutamine-dependent NAD(+) synthetase	Azote	
Rosa_BI_20160929_017805	22	45	glutamine-dependent NAD(+) synthetase	Azote	
Rosa_BI_20160929_040513	50	4	GLUTAMINE DUMPER 3	Azote	
Rosa_BI_20160929_005755	45	3	GLUTAMINE DUMPER 1-like	Azote	
Rosa_BI_20160929_024612	118	70	homocysteine S-methyltransferase 2-like	Azote	Méthionine
Rosa_BI_20160929_004517	35	69	acireductone dioxygenase family	Azote	
Rosa_BI_20160929_066171	30	10	methionine aminopeptidase 2B- partial	Azote	
Rosa_BI_20160929_063775	2110	1044	alanine aminotransferase 2	Azote	Alanine
Rosa_BI_20160929_071131	1716	3713	phenylalanine ammonia-lyase 1	Azote	Phénylalanine
Rosa_BI_20160929_067383	993	2282	phenylalanine ammonia-lyase	Azote	
Rosa_BI_20160929_050530	18	41	1,4-dihydroxy-2-naphthoyl- thioesterase 1-like	Azote	
Rosa_BI_20160929_048023	270	466	Shikimate chloroplastic-like	Azote	
Rosa_BI_20160929_006316	3	15	cinnamate 4-hydroxylase	Azote	
Rosa_BI_20160929_044664	2797	5012	cinnamate 4-hydroxylase	Azote	
Rosa_BI_20160929_062454	457	750	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase 2	Azote	
Rosa_BI_20160929_046620	8	0	chorismate mutase chloroplastic	Azote	
Rosa_BI_20160929_041505	109	247	arogenate dehydratase prephenate dehydratase chloroplastic	Azote	
Rosa_BI_20160929_015986	8	25	glycine-rich RNA-binding	Azote	
Rosa_BI_20160929_006767	1804	875	glycine-rich -like	Azote	Glycine
Rosa_BI_20160929_004677	59	30	glycine-rich RNA-binding mitochondrial	Azote	
Rosa_BI_20160929_050326	1916	928	glycine-rich -like	Azote	
Rosa_BI_20160929_006766	1533	718	glycine-rich -like	Azote	
Rosa_BI_20160929_074552	169	297	glycine dehydrogenase (decarboxylating) mitochondrial	Azote	
Rosa_BI_20160929_049502	3	15	aspartic ase 2 isoform X1	Azote	
Rosa_BI_20160929_051535	67	30	aspartic ase 1	Azote	
Rosa_BI_20160929_050622	27	52	aspartic ase-like	Azote	
Rosa_BI_20160929_006922	27	55	aspartic ase Asp1-like	Azote	
Rosa_BI_20160929_018281	199	326	ASPARTIC PROTEASE IN GUARD CELL 2-like	Azote	
Rosa_BI_20160929_045030	207	126	ASPARTIC PROTEASE IN GUARD CELL 1-like	Azote	
Rosa_BI_20160929_045031	224	114	ASPARTIC PROTEASE IN GUARD CELL 1-like	Azote	
Rosa_BI_20160929_065347	12	35	cysteine-rich receptor kinase 25	Azote	Cystéine
Rosa_BI_20160929_006001	18	40	cysteine-rich receptor kinase 25	Azote	
Rosa_BI_20160929_043013	37	79	cysteine-rich repeat secretory 38-like	Azote	
Rosa_BI_20160929_065342	51	99	cysteine-rich receptor kinase 25	Azote	
Rosa_BI_20160929_056658	26	53	aminoacylase- partial	Azote	

Rosa_BI_20160929_008421	47	83	IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 4	Azote	
Rosa_BI_20160929_068670	231	134	70 kDa peptidyl-prolyl isomerase-like	Azote	
Rosa_BI_20160929_061323	60	100	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase PASTICCINO1	Azote	
Rosa_BI_20160929_043994	102	62	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP15-1	Azote	
Rosa_BI_20160929_039190	184	101	N-acyl-D-amino-acid deacylase domain partial	Azote	
Rosa_BI_20160929_039191	96	59	N-acyl-D-amino-acid deacylase domain partial	Azote	
Rosa_BI_20160929_046901	37	13	N-acyl-D-amino-acid deacylase domain partial	Azote	
Rosa_BI_20160929_044638	130	60	N-acyl-D-amino-acid deacylase domain partial	Azote	
Rosa_BI_20160929_072105	7	26	ACT domain-containing ACR9-like	Azote	
Rosa_BI_20160929_053219	9	28	ACT domain-containing ACR10	Azote	
Rosa_BI_20160929_024763	18	54	ACT domain-containing ACR10-like	Azote	
Rosa_BI_20160929_041829	12	32	ACT domain-containing ACR1	Azote	
Rosa_BI_20160929_007842	12	30	ACT domain-containing ACR4-like	Azote	
Rosa_BI_20160929_005478	454	141	LOB domain-containing 37-like	Azote	
Rosa_BI_20160929_041504	103	255	arogenate dehydratase prephenate dehydratase chloroplastic	Azote	
Rosa_BI_20160929_066850	23	57	-L-isospartate O-methyltransferase 1-like isoform X1	Azote	
Rosa_BI_20160929_011214	13	32	pentatricopeptide repeat-containing mitochondrial-like	Azote	
Rosa_BI_20160929_040644	729	1241	thiol protease aleurain-like	Azote	
Rosa_BI_20160929_071318	9	0	LON peptidase N-terminal domain and RING finger 1	Azote	
Rosa_BI_20160929_045258	30	71	carboxyl-terminal-processing peptidase chloroplastic	Azote	
Rosa_BI_20160929_008073	42	20	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP43 isoform X1	Azote	
Rosa_BI_20160929_006399	43	15	bidirectional sugar transporter SWEET9-like	Sucres	Transport
Rosa_BI_20160929_003265	46	17	sugar transporter ERD6-like 16	Sucres	
Rosa_BI_20160929_072273	18	41	sugar transport 5-like	Sucres	
Rosa_BI_20160929_056515	1157	555	glucose-6-phosphate phosphate translocator chloroplastic	Sucres	
Rosa_BI_20160929_053538	66	37	probable sugar phosphate translocator At3g14410	Sucres	
Rosa_BI_20160929_008156	0	8	tetratricopeptide repeat 7A	Sucres	
Rosa_BI_20160929_008156	0	8	tetratricopeptide repeat 7A	Sucres	
Rosa_BI_20160929_021819	135	73	probable galactinol--sucrose galactosyltransferase 1	Sucres	
Rosa_BI_20160929_061229	112	61	probable galactinol--sucrose galactosyltransferase 1	Sucres	
Rosa_BI_20160929_021060	25	54	galactinol--sucrose galactosyltransferase-like	Sucres	Tréhalose
Rosa_BI_20160929_052388	78	166	probable trehalose-phosphate phosphatase J	Sucres	
Rosa_BI_20160929_052386	235	473	probable trehalose-phosphate phosphatase J	Sucres	
Rosa_BI_20160929_052387	72	142	probable trehalose-phosphate phosphatase J	Sucres	
Rosa_BI_20160929_005934	24	56	sucrose synthase 2 (SUSY)	Sucres	
Rosa_BI_20160929_053094	200	87	alpha-xylosidase 1	Sucres	
Rosa_BI_20160929_049896	82	145	probable beta-D-xylosidase 5 isoform X2	Sucres	
Rosa_BI_20160929_064405	48	20	aldose 1-epimerase	Sucres	
Rosa_BI_20160929_025774	57	96	probable aldo-keto reductase 2	Sucres	
Rosa_BI_20160929_026570	8	0	probable mannitol dehydrogenase	Sucres	
Rosa_BI_20160929_007321	25	54	scopoletin glucosyltransferase-like	Sucres	

Rosa_BI_20160929_064922	278	494	cysteine desulfurase	Soufre
Rosa_BI_20160929_062686	168	96	ATP sulfurylase 2-like	Soufre
Rosa_BI_20160929_055409	49	22	SULFUR DEFICIENCY-INDUCED 1	Soufre
Rosa_BI_20160929_046038	100	49	SULFUR DEFICIENCY-INDUCED 2	Soufre
Rosa_BI_20160929_035849	799	1393	thiosulfate sulfurtransferase 18 isoform X1	Soufre
Rosa_BI_20160929_094789	17	49	Sulfite exporter family isoform 1	Soufre
Rosa_BI_20160929_015735	61	26	SPX domain-containing 1-like	Phosphate
Rosa_BI_20160929_015874	77	43	SPX and EXS domain-containing 1 isoform X1	Phosphate
Rosa_BI_20160929_066284	76	38	potassium transporter 6-like isoform X2	Potassium
Rosa_BI_20160929_000170	56	97	potassium channel AKT1	Potassium
Rosa_BI_20160929_060920	28	66	acyl- -binding domain-containing 3-like	Lipides
Rosa_BI_20160929_034679	13	46	post-GPI attachment to s factor 3	Lipides
Rosa_BI_20160929_017743	35	78	allene oxide synthase	Lipides
Rosa_BI_20160929_047509	43	75	allene oxide synthase	Lipides
Rosa_BI_20160929_046459	147	86	acyl carrier mitochondrial-like	Lipides
Rosa_BI_20160929_001376	17	40	early endosome antigen 1	Lipides
Rosa_BI_20160929_046821	41	86	probable glycerol-3-phosphate acyltransferase 3	Lipides
Rosa_BI_20160929_049331	40	72	glycerol-3-phosphate 2-O-acyltransferase 6-like	Lipides
Rosa_BI_20160929_098978	1	12	ECERIFERUM 1-like	Lipides
Rosa_BI_20160929_015342	0	9	phospholipid:diacylglycerol acyltransferase 1	Lipides
Rosa_BI_20160929_040968	0	8	fatty acid amide hydrolase-like	Lipides
Rosa_BI_20160929_044578	16	3	triacylglycerol lipase 2	Lipides
Rosa_BI_20160929_007533	16	74	GDSL esterase lipase At1g29670-like	Lipides
Rosa_BI_20160929_002544	92	189	GDSL esterase lipase 1-like	Lipides
Rosa_BI_20160929_054700	123	213	GDSL esterase lipase 1-like	Lipides
Rosa_BI_20160929_009114	189	105	GDSL esterase lipase At5g14450-like	Lipides
Rosa_BI_20160929_041688	14	62	GDSL esterase lipase 1-like	Lipides
Rosa_BI_20160929_009056	142	292	phospholipase A1-IIdelta-like	Lipides
Rosa_BI_20160929_073310	74	130	phospholipid-transporting ATPase 4 isoform X2	Lipides
Rosa_BI_20160929_043317	752	434	non-specific lipid transfer precursor	Lipides
Rosa_BI_20160929_011645	28	61	phosphatidylinositol 3- root isoform	Lipides
Rosa_BI_20160929_050805	234	122	omega-3 fatty acid endoplasmic reticulum-like	Lipides
Rosa_BI_20160929_004911	1	15	organic cation carnitine transporter 3	Lipides
Rosa_BI_20160929_058974	11	54	organic cation carnitine transporter 3-like	Lipides
Rosa_BI_20160929_027970	7	22	Carboxylesterase 18	Lipides
Rosa_BI_20160929_058973	17	41	organic cation carnitine transporter 3-like	Lipides
Rosa_BI_20160929_044624	14	2	N-acylphosphatidylethanolamine synthase	Lipides
Rosa_BI_20160929_065939	128	58	NMT1 : phosphoethanolamine N-methyltransferase 1	Lipides
Rosa_BI_20160929_065940	116	57	NMT1 : phosphoethanolamine N-methyltransferase 2	Lipides
Rosa_BI_20160929_065938	157	55	NMT1 : phosphoethanolamine N-methyltransferase 3	Lipides
Rosa_BI_20160929_018337	31	86	probable glycerol-3-phosphate acyltransferase 3	Lipides

Rosa_BI_20160929_025120	23	62	acetyl- carboxylase 1-like	Lipides
Rosa_BI_20160929_077290	1122	2309	acetyl- carboxylase 1-like	Lipides
Rosa_BI_20160929_024079	63	113	12-oxophytodienoate reductase 3-like	Lipides
Rosa_BI_20160929_000121	41	79	lecithin-cholesterol acyltransferase-like 4	Lipides
Rosa_BI_20160929_007738	192	461	probable acyl-activating enzyme peroxisomal	Lipides
Rosa_BI_20160929_044899	5	19	enoyl- delta isomerase peroxisomal	Lipides
Rosa_BI_20160929_022601	17	41	peroxisomal 2,4-dienoyl- reductase-like	Lipides

Annexe IV : liste des séquences exprimées de manière différente (nombre de reads) en réponse au nitrate en présence de saccharose dans la catégorie « Métabolisme des protéines ».

Annotations chez le rosier	+S+N	+S-N	Fonction de la séquence	Sous-catégorie
Rosa_BI_20160929_012220	24	6	Retrovirus-related Pol poly from transposon TNT 1-94	Assemblage
Rosa_BI_20160929_027048	46	1	Retrovirus-related Pol poly from transposon TNT 1-94	Assemblage
Rosa_BI_20160929_003179	24	8	Retrovirus-related Pol poly from transposon TNT 1-94	Assemblage
Rosa_BI_20160929_048870	26	6	Luminal-binding protein 4	Assemblage
Rosa_BI_20160929_044753	12	32	auxilin 1	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_045419	2	17	NEP1-interacting -like 1	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_040236	74	41	PAN domain-containing At5g03700	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_040235	38	16	PAN domain-containing At5g03700	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_037124	16	3	PAN domain-containing At5g03700	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_068670	231	134	70 kDa peptidyl-prolyl isomerase-like	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_043994	102	62	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP15-1	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_008073	42	20	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP43 isoform X1	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_061323	60	100	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase PASTICCINO1	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_012547	20	43	Sacsin	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_000766	958	198	BAG family molecular chaperone regulator 6 isoform X1	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_076603	55	15	BAG family molecular chaperone regulator 6 isoform X3	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_000767	368	98	BAG family molecular chaperone regulator 6 isoform X2	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_019702	199	115	BAG family molecular chaperone regulator 7-like	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_054680	192	109	BAG family molecular chaperone regulator 7-like	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_014945	0	9	heat shock 81-2	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_043307	258	32	small heat shock chloroplastic-like	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_023071	25	4	kDa class I heat shock -like	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_045861	23	4	small heat shock chloroplastic-like	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_006016	75	15	class I heat shock -like	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_059620	25	5	kDa class II heat shock	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_002411	24	5	kDa class I heat shock -like	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_045862	25	6	small heat shock chloroplastic-like	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_011992	99	25	kDa class I heat shock -like	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_015706	1626	444	kDa class I heat shock -like	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_053997	361	104	heat shock 70 kDa	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_055819	30	10	kDa heat shock peroxisomal-like	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_011747	69	24	heat shock 70 kDa 8	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_051410	129	50	kDa class I heat shock -like	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_045472	36	14	kDa class I heat shock -like	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_059622	190	86	kDa class II heat shock	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_051023	50	24	kDa heat shock mitochondrial-like	Repliement et stabilité

Rosa_BI_20160929_059621	331	177	kDa class II heat shock	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_074988	626	384	heat shock 83-like	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_048971	93	30	probable mitochondrial chaperone BCS1-B	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_060039	168	101	chaperonin CPN60- mitochondrial	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_053842	280	636	chaperone dnaJ chloroplastic	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_059118	50	25	chaperone dnaJ mitochondrial	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_036571	162	308	chaperone dnaJ chloroplastic	Repliement et stabilité
Rosa_BI_20160929_045498	80	172	U-box domain-containing 9 isoform X1	Dégradation
Rosa_BI_20160929_051770	61	106	U-box domain-containing 14	Dégradation
Rosa_BI_20160929_051771	91	151	U-box domain-containing 14	Dégradation
Rosa_BI_20160929_072245	82	134	U-box domain-containing 43-like	Dégradation
Rosa_BI_20160929_048275	107	178	BTB POZ domain-containing At3g50780	Dégradation
Rosa_BI_20160929_065743	0	9	ubiquitin-NEDD8 RUB2	Dégradation
Rosa_BI_20160929_017437	2	15	E3 ubiquitin- ligase KEG-like isoform X3	Dégradation
Rosa_BI_20160929_026618	8	31	ubiquinol mitochondrial-like	Dégradation
Rosa_BI_20160929_014794	8	25	probable E3 ubiquitin- ligase RHA2B	Dégradation
Rosa_BI_20160929_044842	24	8	E3 ubiquitin- ligase RGLG2	Dégradation
Rosa_BI_20160929_049658	15	40	E3 ubiquitin- ligase RNF14	Dégradation
Rosa_BI_20160929_013902	17	41	E3 ubiquitin- ligase UPL2-like	Dégradation
Rosa_BI_20160929_043071	22	49	E3 ubiquitin- ligase RING1-like	Dégradation
Rosa_BI_20160929_059394	23	49	E3 ubiquitin- ligase At3g02290-like	Dégradation
Rosa_BI_20160929_014620	80	166	E3 ubiquitin- ligase ATL31-like	Dégradation
Rosa_BI_20160929_041846	98	179	E3 ubiquitin- ligase RGLG1 isoform X1	Dégradation
Rosa_BI_20160929_046379	119	69	ubiquitin-related modifier 1 homolog 2	Dégradation
Rosa_BI_20160929_052296	49	84	E3 ubiquitin- ligase PRT1	Dégradation
Rosa_BI_20160929_048237	208	345	ubiquitin-conjugating enzyme E2-23 kDa	Dégradation
Rosa_BI_20160929_044307	76	39	calcyclin-binding -like	Dégradation
Rosa_BI_20160929_046064	0	10	F-box FBD LRR-repeat At1g13570-like isoform X1	Dégradation
Rosa_BI_20160929_005463	2	13	F-box FBD LRR-repeat At1g78750-like	Dégradation
Rosa_BI_20160929_066852	28	5	F-box FBD LRR-repeat At5g56420-like	Dégradation
Rosa_BI_20160929_002934	7	25	BEACH domain-containing lvsA isoform X1	Dégradation
Rosa_BI_20160929_042458	7	24	F-box At3g54460- partial	Dégradation
Rosa_BI_20160929_040477	10	30	F-box PP2-B15-like	Dégradation
Rosa_BI_20160929_040478	22	60	F-box PP2-B15-like	Dégradation
Rosa_BI_20160929_076228	34	14	F-box At1g70590	Dégradation
Rosa_BI_20160929_040476	56	132	F-box PP2-B15-like	Dégradation
Rosa_BI_20160929_047563	28	58	F-box LRR-repeat 10	Dégradation
Rosa_BI_20160929_051379	38	67	F-box At2g39490-like	Dégradation
Rosa_BI_20160929_038763	90	155	F-box At1g22220	Dégradation
Rosa_BI_20160929_002009	13	34	proteasome-associated ECM29 homolog	Dégradation
Rosa_BI_20160929_051150	106	54	26S proteasome regulatory subunit 4 homolog A-like	Dégradation

Rosa_BI_20160929_042642	0	8	Cullin-1-like	Dégradation
Rosa_BI_20160929_002387	133	257	RING U-box superfamily isoform 2	Dégradation
Rosa_BI_20160929_013490	45	21	SKP1 21	Dégradation
Rosa_BI_20160929_041882	43	19	BTB POZ domain-containing At1g03010-like isoform X2	Dégradation
Rosa_BI_20160929_059652	68	130	BTB POZ domain-containing At1g55760	Dégradation
Rosa_BI_20160929_071318	9	0	LON peptidase N-terminal domain and RING finger 1	Modification
Rosa_BI_20160929_068797	179	340	zingipain-2-like isoform X1	Modification
Rosa_BI_20160929_009173	46	21	Dolichyl pyrophosphate Glc1Man9 c2 alpha-1,3-glucosyltransferase	Modification (Glycosylation)
Rosa_BI_20160929_064277	18	39	Alpha-mannosidase	Modification (Glycosylation)
Rosa_BI_20160929_013946	70	33	beta-galactosidase 10	Modification (Glycosylation)
Rosa_BI_20160929_073334	114	211	CMP-N-acetylneuraminat-beta-galactosamide-alpha-2,3-sialyltransferase 1-like	Modification (Glycosylation)
Rosa_BI_20160929_018220	72	33	glycerophosphodiester phosphodiesterase chloroplastic-like	Modification (Glycosylation)
Rosa_BI_20160929_028859	12	31	Beta-1,3-galactosyltransferase 16	Modification (Glycosylation)
Rosa_BI_20160929_041206	69	39	11S globulin seed storage 2-like	Modification (Glycosylation)
Rosa_BI_20160929_016944	8	0	basic 7S globulin	Modification (Glycosylation)
Rosa_BI_20160929_046531	29	8	ABC transporter D family member chloroplastic isoform X2	Transporteurs généraux
Rosa_BI_20160929_068465	22	48	ABC transporter G family member 24-like	Transporteurs généraux
Rosa_BI_20160929_006047	144	86	mechanosensitive ion channel 10-like	Transporteurs généraux
Rosa_BI_20160929_055947	30	62	probable anion transporter chloroplastic	Transporteurs généraux
Rosa_BI_20160929_016370	63	120	probable anion transporter chloroplastic	Transporteurs généraux
Rosa_BI_20160929_031529	4	24	ARF guanine-nucleotide exchange factor GNOM-like	Transporteurs généraux
Rosa_BI_20160929_053150	19	5	tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase	Transporteurs généraux
Rosa_BI_20160929_016173	55	101	equilibrative nucleotide transporter 8	Transporteurs généraux
Rosa_BI_20160929_008867	84	142	adenine guanine permease AZG1	Transporteurs généraux
Rosa_BI_20160929_042198	18	40	cyclic nucleotide-gated ion channel 1-like	Transporteurs généraux
Rosa_BI_20160929_013630	23	71	equilibrative nucleotide transporter 3-like	Transporteurs généraux

Annexe V : liste des séquences exprimées de manière différente (nombre de reads) en réponse au nitrate en présence de saccharose dans la catégorie « Croissance cellulaire ».

Annotations chez le rosier	+S+N	+S-N	Fonction de la séquence	Sous-catégories
Rosa_BI_20160929_056144	127	234	Protein SRG1	Division
Rosa_BI_20160929_052571	65	26	cell division cycle 27 homolog isoform X1	Division
Rosa_BI_20160929_043911	42	17	cell division control 2 homolog C	Division
Rosa_BI_20160929_021987	235	396	cell division cycle ATPase	Division
Rosa_BI_20160929_023974	17	4	cell division chloroplastic	Division
Rosa_BI_20160929_007103	14	2	cell division homolog 2- chloroplastic-like	Division
Rosa_BI_20160929_039342	2	16	aquaporin NIP6-1	Métabolisme de l'eau
Rosa_BI_20160929_018873	16	71	aquaporin SIP1-1-like	Métabolisme de l'eau
Rosa_BI_20160929_075913	464	955	probable inactive poly [ADP-ribose] polymerase SRO5	Métabolisme de l'eau
Rosa_BI_20160929_002205	502	993	probable inactive poly [ADP-ribose] polymerase SRO5	Métabolisme de l'eau
Rosa_BI_20160929_051653	36	15	probable aquaporin PIP2-5	Métabolisme de l'eau
Rosa_BI_20160929_012670	277	150	aquaporin PIP2-1-like	Métabolisme de l'eau
Rosa_BI_20160929_064551	45	14	endoglucanase CX-like	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_057603	141	334	7-deoxyloganetin glucosyltransferase-like	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_003564	18	50	glucan endo-1,3-beta-glucosidase 12	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_005595	391	219	pistil-specific extensin	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_068801	60	105	bifunctional epoxide hydrolase 2-like isoform X1	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_006080	17	42	Protein IRX15-LIKE-like	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_004874	62	104	flocculation FLO11-like	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_043603	67	38	RETICULATA-RELATED chloroplastic	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_072596	636	240	cell wall-associated hydrolase	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_077392	33	64	wall-associated receptor kinase-like 16	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_092090	19	0	glucan endo-1,3-beta-glucosidase-like precursor	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_063666	10	37	subtilisin-like protease	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_009508	19	58	laccase-14- partial	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_038698	0	13	Laccase-14-like	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_001290	4	20	laccase-14-like isoform X2	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_019964	100	295	Laccase-14-like	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_011264	164	410	Laccase-14-like	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_005416	27	52	subtilisin-like protease	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_071493	135	236	subtilisin-like protease	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_061240	323	195	subtilisin-like protease	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_077837	6	26	cellulose synthase H1	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_022282	10	27	glycine-rich cell wall structural -like	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_050340	293	622	dihydrofolate reductase-like	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_058953	47	23	bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase-like	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_006771	357	704	dihydrofolate reductase-like	Parois cellulaires

Rosa_BI_20160929_023806	33	61	cellulose synthase H1	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_072648	218	384	cellulose synthase A catalytic subunit 2 [UDP-forming]-like	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_004236	20	2	probable xyloglucan endotransglucosylase hydrolase 32	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_051342	62	134	pectinesterase 3	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_045348	38	73	probable pectinesterase inhibitor 47	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_051446	95	53	pectinesterase 3-like	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_048721	41	13	pectate lyase-like	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_036167	40	17	pectate lyase 18	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_067710	1424	766	6-phosphogluconate decarboxylating chloroplastic	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_059016	194	52	polygalacturonase At1g48100-like	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_061872	192	114	polygalacturonase At1g48100	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_047018	398	709	probable xyloglucan endotransglucosylase hydrolase 23	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_054709	21	4	pectin acetylterase 3 isoform X2	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_059252	22	4	expansin 1	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_054468	292	126	Expansin-A1-like	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_054466	276	126	expansin 4 family	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_052519	242	125	alpha expansin	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_076729	52	86	trichohyalin-like isoform X1	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_065799	296	502	VACUOLELESS1 isoform X2	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_051367	55	95	cinnamoyl- reductase 2-like	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_015947	302	514	cinnamoyl- reductase 2-like	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_050233	71	119	cinnamoyl- reductase 1	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_050939	46	79	probable boron transporter 2	Parois cellulaires
Rosa_BI_20160929_015997	13	2	probable myosin-binding 4	Cytosquelette
Rosa_BI_20160929_033634	31	59	MAP7 domain-containing 3	Cytosquelette
Rosa_BI_20160929_009794	77	136	methylesterase chloroplastic	Cytosquelette
Rosa_BI_20160929_002429	13	2	kinesin-4 isoform X1	Cytosquelette
Rosa_BI_20160929_054833	77	37	125 kDa kinesin-related -like	Cytosquelette
Rosa_BI_20160929_109641	0	10	microtubule-associated 70-5	Cytosquelette
Rosa_BI_20160929_046867	22	7	actin-related 7	Cytosquelette
Rosa_BI_20160929_014408	71	117	phosphoinositide phosphatase SAC1	Cytosquelette
Rosa_BI_20160929_004953	35	12	microtubule-associated TORTIFOLIA1	Cytosquelette
Rosa_BI_20160929_049852	23	4	POOR HOMOLOGOUS SYNOPSIS 1-like isoform X1	Cytosquelette
Rosa_BI_20160929_060291	32	63	WVD2-like 4	Cytosquelette
Rosa_BI_20160929_066996	65	125	PLASTID MOVEMENT IMPAIRED 1	Cytosquelette
Rosa_BI_20160929_008885	9	30	coiled-coil domain-containing 115 isoform X2	ER/Golgi
Rosa_BI_20160929_063197	51	22	AP-4 complex subunit mu-like isoform X1	ER/Golgi
Rosa_BI_20160929_071968	20	3	ankyrin repeat-containing At5g02620-like isoform X2	ER/Golgi
Rosa_BI_20160929_075821	11	37	ankyrin repeat-containing At5g02620-like isoform X1	ER/Golgi
Rosa_BI_20160929_073051	35	68	ankyrin repeat-containing At5g02620-like	ER/Golgi
Rosa_BI_20160929_023337	74	130	ankyrin repeat-containing At5g02620-like	ER/Golgi

Rosa_BI_20160929_056098	49	83	ankyrin repeat-containing At5g02620-like	ER/Golgi
Rosa_BI_20160929_056097	52	86	ankyrin repeat-containing At5g02620-like	ER/Golgi
Rosa_BI_20160929_044978	39	69	HVA22-like protein	Membrane
Rosa_BI_20160929_109628	587	267	orf145 (mitochondrion)	Membrane
Rosa_BI_20160929_050804	58	106	CASP 1D1	Membrane
Rosa_BI_20160929_017425	89	155	CASP 1D1	Membrane
Rosa_BI_20160929_023895	14	33	stigma-specific STIG1 1	Membrane
Rosa_BI_20160929_061786	17	38	stigma-specific STIG1 1	Membrane
Rosa_BI_20160929_011481	16	43	PHLOEM PROTEIN 2-LIKE A10-like	Phloème
Rosa_BI_20160929_001796	400	207	SIEVE ELEMENT OCCLUSION B-like	Phloème
Rosa_BI_20160929_002281	50	113	stem-specific TSJT1-like	Tige
Rosa_BI_20160929_060160	73	132	syntaxin-22-like	Vacuole
Rosa_BI_20160929_047172	55	91	Syntaxin-121	Vacuole
Rosa_BI_20160929_040979	2	14	vacuolar sorting-associated 35B-like isoform X2	Vacuole
Rosa_BI_20160929_035529	7	31	vacuolar cation proton exchanger 3-like	Vacuole
Rosa_BI_20160929_011104	49	152	lysosomal beta glucosidase-like	Vacuole
Rosa_BI_20160929_050334	10	27	CBS domain-containing CBSX6	Vacuole

Annexe VI : liste des séquences exprimées de manière différente (nombre de reads) en réponse au nitrate en présence de saccharose dans la catégorie « Métabolisme énergétique ».

Annotations chez le rosier	+S+N	+S-N	Fonction de la séquence	Sous-catégories	
Rosa_BI_20160929_050829	17	3	PEPCK - phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]-like	Cycle de Krebs et mitochondrie	
Rosa_BI_20160929_024019	9	27	PEPC : phosphoenolpyruvate carboxylase 4 isoform X1		
Rosa_BI_20160929_058256	199	357	ATP-dependent 6-phosphofructokinase 3-like		
Rosa_BI_20160929_004778	70	116	ATP-dependent 6-phosphofructokinase 6		
Rosa_BI_20160929_028948	15	38	pyruvate cytosolic isozyme-like		
Rosa_BI_20160929_005571	8	28	pyruvate kinase family		
Rosa_BI_20160929_042472	80	144	pyruvate kinase-like		
Rosa_BI_20160929_005440	24	54	pyruvate kinase-like		
Rosa_BI_20160929_004399	157	308	pyruvate kinase cytosolic-like		
Rosa_BI_20160929_021816	48	87	pyruvate decarboxylase		
Rosa_BI_20160929_010468	1520	2634	pyruvate decarboxylase		
Rosa_BI_20160929_023181	1951	3364	pyruvate decarboxylase		
Rosa_BI_20160929_008219	2869	4772	pyruvate decarboxylase 1		
Rosa_BI_20160929_042854	8	0	NADH dehydrogenase subunit 4 (mitochondrion)		
Rosa_BI_20160929_001779	278	149	ATP synthase subunit partial (mitochondrion)		
Rosa_BI_20160929_015673	23	3	ATPase subunit 6 (mitochondrion)		
Rosa_BI_20160929_006457	94	55	cytochrome c-type biogenesis		
Rosa_BI_20160929_026150	48	82	cytochrome b6 (chloroplast)		
Rosa_BI_20160929_045736	43	16	Malate dehydrogenase, glyoxysomal		
Rosa_BI_20160929_005265	45	22	NUCLEAR FUSION DEFECTIVE chloroplastic mitochondrial-like		
Rosa_BI_20160929_058252	59	110	NUCLEAR FUSION DEFECTIVE 4-like		
Rosa_BI_20160929_012159	18	3	NUCLEAR FUSION DEFECTIVE chloroplastic mitochondrial-like isoform X1		
Rosa_BI_20160929_058253	123	245	NUCLEAR FUSION DEFECTIVE 4-like		
Rosa_BI_20160929_058254	64	147	NUCLEAR FUSION DEFECTIVE 4-like		
Rosa_BI_20160929_048210	274	92	NUCLEAR FUSION DEFECTIVE 4-like		
Rosa_BI_20160929_051294	30	68	(-)-isopiperitenol (-)-carveol mitochondrial-like		
Rosa_BI_20160929_018657	28	8	isocitrate dehydrogenase [NAD] regulatory subunit mitochondrial-like		
Rosa_BI_20160929_023523	26	6	ribulose-1,5 bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit N-chloroplastic isoform X3		Photosynthèse
Rosa_BI_20160929_071357	4	19	ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase chloroplastic-like		
Rosa_BI_20160929_071354	10	30	ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase chloroplastic-like		
Rosa_BI_20160929_071353	6	25	ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase chloroplastic-like		
Rosa_BI_20160929_026868	13	2	RuBisCO - ribulose bisphosphate carboxylase small chain chloroplastic-like		
Rosa_BI_20160929_018580	374	621	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase		
Rosa_BI_20160929_051376	385	695	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase		
Rosa_BI_20160929_017956	1259	410	ferredoxin--NADP root chloroplastic		
Rosa_BI_20160929_046066	2359	1445	ferredoxin--nitrite chloroplastic		
Rosa_BI_20160929_053130	9	0	probable fructokinase- chloroplastic		

Rosa_BI_20160929_020643	24	7	photosystem II CP43 chlorophyll apo (chloroplast)
Rosa_BI_20160929_092154	33	8	photosystem II D1 (chloroplast)
Rosa_BI_20160929_018203	1265	441	ferredoxin--NADP root chloroplastic
Rosa_BI_20160929_048251	611	302	probable ribose-5-phosphate isomerase 2
Rosa_BI_20160929_066561	47	21	ATP-dependent RNA helicase DBP3-like
Rosa_BI_20160929_010537	7	22	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit
Rosa_BI_20160929_020978	4003	2339	plasma membrane ATPase 4
Rosa_BI_20160929_017141	13	39	pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit beta-like
Rosa_BI_20160929_004327	57	130	F-box kelch-repeat At1g67480
Rosa_BI_20160929_014217	50	108	F-box kelch-repeat At1g67480
Rosa_BI_20160929_023422	179	361	transport and Golgi organization 2 homolog
Rosa_BI_20160929_009003	131	256	kelch repeat-containing At3g27220-like
Rosa_BI_20160929_026361	161	306	transport and Golgi organization 2 homolog
Rosa_BI_20160929_023570	477	881	endoplasmic reticulum oxidoreductin-1-like
Rosa_BI_20160929_024472	1697	3023	endoplasmic reticulum oxidoreductin-1-like
Rosa_BI_20160929_023014	20	5	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase chloroplastic
Rosa_BI_20160929_065581	1	12	bifunctional riboflavin kinase FMN phosphatase-like
Rosa_BI_20160929_065978	108	61	calcium-transporting endoplasmic reticulum-type
Rosa_BI_20160929_006473	136	230	F-box kelch-repeat At2g44130-like
Rosa_BI_20160929_053194	3	17	Ribokinase
Rosa_BI_20160929_067537	60	29	mediator of RNA polymerase II Transcription subunit 16
Rosa_BI_20160929_000062	49	82	mediator of RNA polymerase II Transcription subunit 4-like
Rosa_BI_20160929_076580	0	10	sirohdrochlorin chloroplastic
Rosa_BI_20160929_065565	0	8	pyrophosphate-energized membrane proton pump 2
Rosa_BI_20160929_000097	79	140	quinone partial
Rosa_BI_20160929_072821	123	73	insulin-degrading enzyme-like
Rosa_BI_20160929_025173	47	79	UTP:RNA uridylyltransferase 1
Rosa_BI_20160929_074189	21	51	probable flavin-containing monooxygenase 1
Rosa_BI_20160929_019788	66	109	FAD synthetase chloroplastic
Rosa_BI_20160929_057036	85	140	telomere repeat-binding 5
Rosa_BI_20160929_079840	13	2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 3-like
Rosa_BI_20160929_059188	18	3	Werner Syndrome-like exonuclease
Rosa_BI_20160929_070547	5	21	double-strand break repair MRE11
Rosa_BI_20160929_005833	207	102	annexin D2-like
Rosa_BI_20160929_059678	42	75	UV-B-induced chloroplastic
Rosa_BI_20160929_042068	84	49	Stellacyanin-like
Rosa_BI_20160929_043623	36	16	thioredoxin-like 3-3
Rosa_BI_20160929_008226	400	183	root R-B1-like
Rosa_BI_20160929_018680	383	183	root R-B1-like
Rosa_BI_20160929_064734	159	84	annexin D2-like
Rosa_BI_20160929_062894	50	89	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing 3

Rosa_BI_20160929_068878	<b>105</b>	<b>59</b>	aldehyde dehydrogenase 22A1
Rosa_BI_20160929_005956	<b>44</b>	<b>75</b>	UPF0187 protein At3g61320, chloroplastic
Rosa_BI_20160929_043937	<b>2</b>	<b>14</b>	UPF0548 At2g17695
Rosa_BI_20160929_059305	<b>400</b>	<b>175</b>	Root R-B1-like ferredoxin
Rosa_BI_20160929_025000	<b>8</b>	<b>0</b>	psbP domain-containing chloroplastic
Rosa_BI_20160929_062883	<b>48</b>	<b>17</b>	psbP domain-containing chloroplastic
Rosa_BI_20160929_058120	<b>22</b>	<b>6</b>	TIC 20- chloroplastic
Rosa_BI_20160929_012780	<b>31</b>	<b>69</b>	STAY- chloroplastic-like
Rosa_BI_20160929_015702	<b>43</b>	<b>108</b>	tonoplast dicarboxylate transporter-like
Rosa_BI_20160929_050530	<b>18</b>	<b>41</b>	1,4-dihydroxy-2-naphthoyl- thioesterase 1-like
Rosa_BI_20160929_002036	<b>184</b>	<b>360</b>	2-aminoethanethiol dioxygenase-like
Rosa_BI_20160929_009997	<b>709</b>	<b>1216</b>	2-aminoethanethiol dioxygenase-like
Rosa_BI_20160929_002036	<b>184</b>	<b>360</b>	2-aminoethanethiol dioxygenase-like
Rosa_BI_20160929_009997	<b>709</b>	<b>1216</b>	2-aminoethanethiol dioxygenase-like

Annexe VII : liste des séquences exprimées de manière différente (nombre de reads) en réponse au nitrate en présence de saccharose dans la catégorie « Réponses aux stress ».

Annotations chez le rosier	+S+N	+S-N	Fonction de la séquence	Sous-catégories	
Rosa_BI_20160929_104492	72	156	jasmonate O-methyltransferase-like	Réponses aux stress	Acide jasmonique
Rosa_BI_20160929_053460	11	32	S-linalool synthase-like isoform X1	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_012790	44	106	S-linalool synthase-like	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_053461	72	151	S-linalool synthase-like	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_009970	37	66	linalool partial	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_025373	66	111	coronatine-insensitive 1	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_051693	58	124	TIFY 5A-like	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_023403	54	26	12-oxophytodienoate reductase 11	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_044445	14	34	TIFY 5A-like	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_017569	59	134	TIFY 5A-like	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_008391	66	35	Bax inhibitor-1 family	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_049448	35	71	DMR6-LIKE OXYGENASE 1	Réponses aux stress	Acide salicylique
Rosa_BI_20160929_005318	3	21	truncated glutathione S-transferase riant4 (GST)	Réponses aux stress	Stress oxydant
Rosa_BI_20160929_046403	140	283	glutathione S-transferase F11-like (GST)	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_069406	323	111	monodehydroascorbate chloroplastic isoform X2 (MDHA)	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_069408	376	139	monodehydroascorbate chloroplastic isoform X1 (MDHA)	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_052074	16	37	L-ascorbate peroxidase peroxisomal-like (APX)	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_037629	881	489	L-ascorbate peroxidase chloroplastic isoform X1 (APX)	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_006638	112	67	L-ascorbate oxidase homolog	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_018996	4	19	peroxidase 25	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_048072	35	15	peroxidase 73-like	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_065028	49	22	peroxidase 63	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_016341	456	219	peroxidase 16-like	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_084101	8	0	UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyltransferase 7-like	Réponses aux stress	Flavonoïdes et anthocyanes
Rosa_BI_20160929_048719	15	50	anthocyanidin reductase	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_015027	20	55	UDP-glucose:flavonol 3-glucosyltransferase	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_040070	112	265	universal stress A	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_010765	962	2205	anthocyanidin reductase	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_010234	230	514	UDP-glucose:flavonol 3-glucosyltransferase	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_054204	20	44	anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase 2-like isoform X2	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_003892	1603	3442	anthocyanidin synthase	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_000580	93	45	flavonoid 3 -monooxygenase-like	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_017938	48	97	UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyltransferase 3	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_008886	1065	2139	leucoanthocyanidin reductase	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_058873	538	1051	flavonoid 3 -hydroxylase	Réponses aux stress	
Rosa_BI_20160929_026346	1835	3477	dihydroflavonol 4-reductase	Réponses aux stress	

Rosa_BI_20160929_058894	86	154	flavonol synthase flavanone 3-hydroxylase-like	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_058874	574	1024	flavonoid 3 -hydroxylase	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_044365	75	131	universal stress A	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_023992	55	96	universal stress A isoform X1	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_007262	3576	6223	flavanone 3-hydroxylase	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_007296	231	133	flavonol synthase flavanone 3-hydroxylase-like	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_053587	84	49	flavonol synthase flavanone 3-hydroxylase-like	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_023294	208	552	chalcone synthase	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_085392	28	74	chalcone partial	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_010525	848	2030	chalcone synthase	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_010555	2044	4570	chalcone synthase	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_025869	679	1454	chalcone synthase	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_023875	134	276	chalcone partial	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_009289	985	1983	chalcone synthase	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_065830	121	231	chalcone partial	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_009288	84	150	chalcone synthase	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_023650	292	520	chalcone isomerase	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_054861	50	22	2-hydroxyisoflavanone dehydratase-like	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_054859	57	30	2-hydroxyisoflavanone dehydratase-like	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_054864	61	33	2-hydroxyisoflavanone dehydratase-like	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_054285	44	85	UDP-glycosyltransferase 73D1-like	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_071908	41	73	UDP-glycosyltransferase 74E1-like	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_052060	33	65	UDP-glycosyltransferase 74E1-like	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_024855	64	107	UDP-glucose: anthocyanidin 5,3-O-glucosyltransferase	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_053007	1165	1907	probable chalcone--flavonone isomerase 3	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_000141	91	148	homeobox-leucine zipper ANTHOCYANINLESS 2 isoform X1	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_035992	155	264	wound-responsive family	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_100330	1573	385	chitinase 5-like	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_059543	96	252	probable 2-aminoethanethiol dioxygenase	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_059542	66	167	probable 2-aminoethanethiol dioxygenase	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_064624	158	327	metal tolerance 10-like	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_109573	451	275	major allergen Pru ar 1-like	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_068108	59	112	heavy metal transport detoxification superfamily	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_025024	140	78	endochitinase PR4-like	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_000555	723	1221	probable metal-nicotianamine transporter YSL7	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_007934	74	123	metal tolerance 1-like	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_040071	180	499	universal stress A	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_073714	39	69	Transcription factor MYC2	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_002883	38	82	geraniol 8-hydroxylase-like	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_011288	73	152	Universal stress A	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_042345	31	63	stress-response A B barrel domain-containing UP3-like	Réponses aux stress

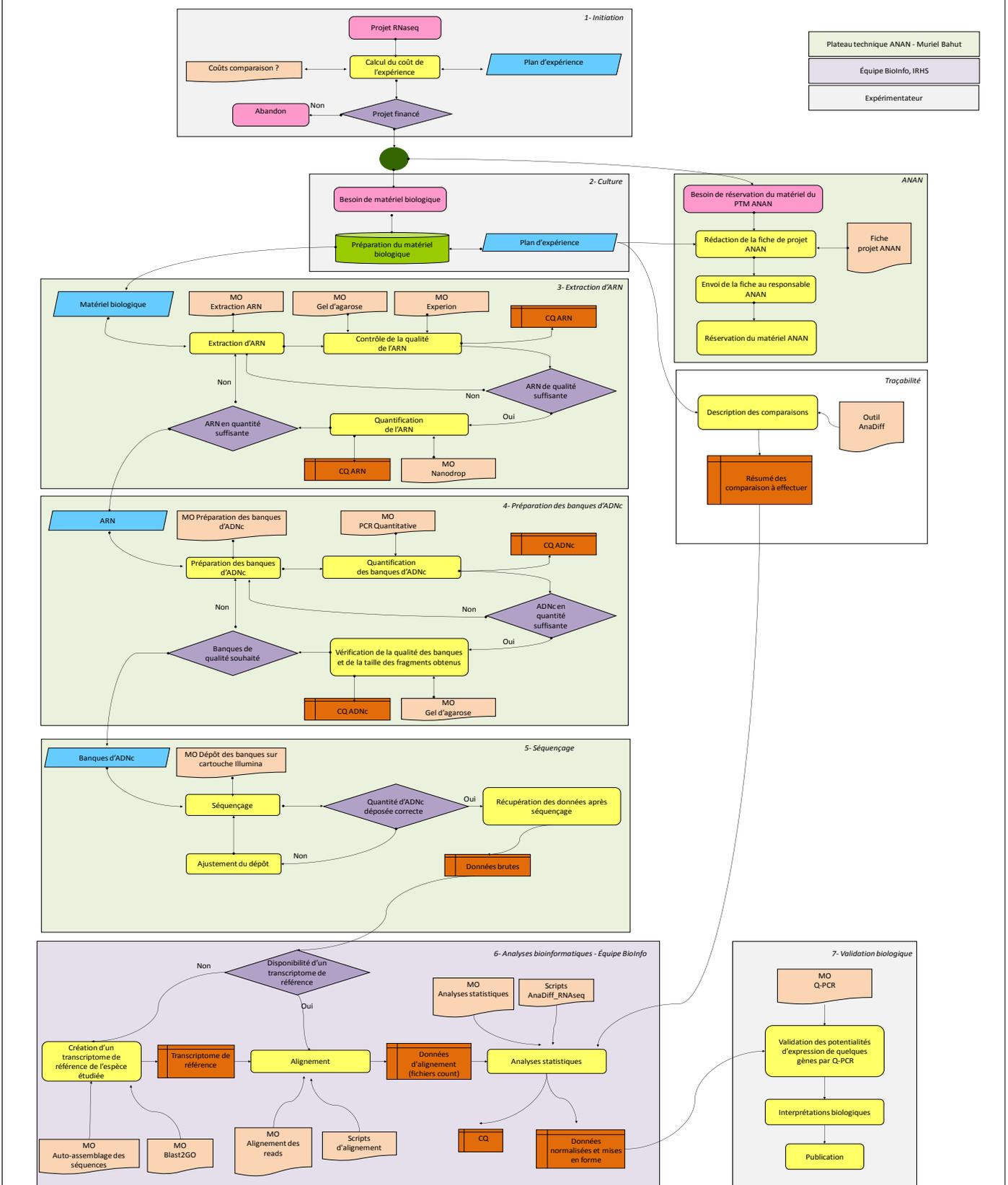
Rosa_BI_20160929_041338	38	75	wound-responsive family	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_019513	49	25	low-temperature-induced 65 kDa isoform X3	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_027052	66	126	universal stress A isoform X1	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_023220	114	211	universal stress A isoform X1	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_009699	160	280	universal stress A isoform X2	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_048615	94	161	stress enhanced chloroplastic	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_010875	66	109	geraniol 8-hydroxylase-like	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_041610	17	63	(S)-tetrahydroprotoberberine N-methyltransferase-like	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_044400	172	45	probable Transcription factor KAN4	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_015738	66	111	probable WRKY Transcription factor 3	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_009971	10	39	(3S,6E)-nerolidol synthase 1-like	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_038081	0	9	(3S,6E)-nerolidol synthase chloroplastic mitochondrial- partial	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_012094	64	107	iron-deficiency-responsive partial	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_057434	32	5	nicotianamine synthase	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_073353	97	160	probable inactive 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase AOP2	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_049314	25	49	polyphenol chloroplastic-like	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_025732	29	67	kaempferol 3-O-beta-D-galactosyltransferase-like	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_051588	101	48	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase DAO-like	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_000456	12	35	WD repeat-containing LWD1-like	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_040057	149	69	metallothiol transferase -like	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_046295	32	62	LNK2 isoform X1	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_046294	46	79	LNK2 isoform X1	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_059676	37	69	UV-B-induced chloroplastic	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_060725	23	55	alcohol dehydrogenase-like 7	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_035310	159	290	alcohol dehydrogenase 1-like	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_041433	1194	2021	alcohol dehydrogenase	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_043728	37	75	heat stress Transcription factor A-5-like	Réponses aux stress
Rosa_BI_20160929_010286	263	496	nematode resistance -like HSPRO2	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_055626	23	5	thaumatin 1b	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_042938	281	462	4-coumarate-- ligase 2-like	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_052810	38	13	osmotin precursor	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_052811	48	19	osmotin precursor	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_042939	600	1405	4-coumarate-- ligase 2-like	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_041051	37	10	basic form of pathogenesis-related 1-like	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_052711	155	79	pathogenesis-related genes Transcriptional activator PTI6-like	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_020994	105	190	pathogenesis-related genes Transcriptional activator PTI5-like	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_052712	103	58	pathogenesis-related genes Transcriptional activator PTI6-like	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_074027	36	16	disease resistance RPP13 4	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_007430	12	1	probable disease resistance At4g27220	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_005313	2	16	disease resistance RPP13 1	Gènes de résistance

Rosa_BI_20160929_036548	2	16	resistance At4g27190-like	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_003168	4	19	disease resistance RGA3	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_003002	9	31	disease resistance At3g14460	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_024183	9	27	disease resistance RPP13 1	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_024373	0	8	SUPPRESSOR OF npr1- CONSTITUTIVE 1-like	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_039593	79	37	defensin Ec-AMP-D2-like	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_068295	17	4	TMV resistance N-like	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_055731	0	9	TMV resistance N-like	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_066222	2	13	TMV resistance N-like	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_006894	4	19	TMV resistance N-like	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_008451	5	23	TMV resistance protein N-like	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_004240	11	31	TMV resistance N-like	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_011000	14	33	TMV resistance N-like isoform X1	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_024159	53	97	TMV resistance N-like	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_062247	55	96	TMV resistance N-like	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_039591	97	50	defensin Ec-AMP-D2-like	Gènes de résistance
Rosa_BI_20160929_058574	35	69	membrane steroid-binding 1-like	Métabolisme secondaire
Rosa_BI_20160929_057276	54	108	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	Métabolisme secondaire
Rosa_BI_20160929_015612	57	105	probable 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase chloroplastic	Métabolisme secondaire
Rosa_BI_20160929_012756	59	99	linolenate hydroperoxide chloroplastic	Métabolisme secondaire
Rosa_BI_20160929_008556	62	16	tricyclene synthase chloroplastic-like	Métabolisme secondaire
Rosa_BI_20160929_000036	44	21	tricyclene synthase chloroplastic-like	Métabolisme secondaire
Rosa_BI_20160929_013686	58	113	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial	Métabolisme secondaire
Rosa_BI_20160929_005256	43	81	salutaridine reductase-like	Métabolisme secondaire
Rosa_BI_20160929_072650	38	14	(S)-coclaurine N-methyltransferase	Métabolisme secondaire
Rosa_BI_20160929_034920	37	15	squalene monooxygenase-like	Métabolisme secondaire

# Annexe VIII : démarche qualité du RNaseq dans le cadre du projet TranscriNoeuds.



Démarche qualité pour un projet de séquençage des transcrits à haut débit rédigé par Marie-Anne Le Moigne.





# ANNEXES des résultats de dosages des acides aminés dans les tissus

Annexe IX : résultats des dosages des acides aminés dans les tissus en réponse au traitement N12.

		N12					
		J+0		J+7		J+14	
Hydroxyproline	Apex	0,03	± 0,01	/	± /	/	± /
	Axes II	/	± /	0,36	± 0,14	0,15	± 0,05
	Feuilles	0,06	± 0,01	0,03	± 0,03	0,00	± 0,00
	Tige	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,01	± 0,02
	Racines	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
Histidine	Apex	0,21	± 0,10	/	± /	/	± /
	Axes II	/	± /	1,88	± 0,37	0,21	± 0,05
	Feuilles	0,05	± 0,02	0,50	± 0,28	0,35	± 0,07
	Tige	0,22	± 0,14	1,72	± 0,37	0,47	± 0,13
	Racines	0,08	± 0,04	0,72	± 0,16	0,37	± 0,04
Sérine	Apex	2,85	± 0,68	/	± /	/	± /
	Axes II	/	± /	9,82	± 5,95	6,35	± 1,50
	Feuilles	2,78	± 0,77	16,29	± 0,50	7,34	± 0,74
	Tige	3,02	± 0,45	8,64	± 3,26	2,42	± 0,35
	Racines	1,20	± 0,17	6,38	± 0,41	3,14	± 0,13
Arginine	Apex	1,67	± 0,59	/	± /	/	± /
	Axes II	/	± /	2,60	± 0,86	1,25	± 0,29
	Feuilles	0,64	± 0,22	2,93	± 1,71	0,99	± 0,24
	Tige	2,89	± 3,09	41,93	± 15,89	7,33	± 3,13
	Racines	2,04	± 0,95	6,40	± 1,32	4,43	± 1,17
Glycine	Apex	0,27	± 0,01	/	± /	/	± /
	Axes II	/	± /	1,32	± 0,25	0,48	± 0,07
	Feuilles	0,21	± 0,04	0,37	± 0,08	0,20	± 0,06
	Tige	0,27	± 0,05	0,30	± 0,12	0,24	± 0,09
	Racines	0,13	± 0,02	0,61	± 0,04	0,37	± 0,01
Glutamate	Apex	16,56	± 1,70	/	± /	/	± /
	Axes II	/	± /	30,12	± 7,43	24,67	± 5,05
	Feuilles	15,83	± 2,22	31,73	± 1,37	18,78	± 0,86
	Tige	8,53	± 1,09	18,60	± 4,79	8,18	± 1,43
	Racines	6,20	± 0,45	11,36	± 0,92	4,43	± 0,47
Alanine	Apex	4,43	± 0,78	/	± /	/	± /
	Axes II	/	± /	13,66	± 3,46	6,02	± 2,20
	Feuilles	3,23	± 0,63	9,59	± 0,77	2,78	± 0,67
	Tige	2,25	± 0,23	5,54	± 1,28	1,68	± 0,43
	Racines	0,96	± 0,12	7,40	± 1,49	1,88	± 0,34
Thréonine	Apex	1,18	± 0,18	/	± /	/	± /
	Axes II	/	± /	2,96	± 0,64	2,25	± 0,47
	Feuilles	0,90	± 0,18	1,94	± 0,11	1,61	± 0,03
	Tige	1,29	± 0,22	2,42	± 0,49	1,04	± 0,10
	Racines	0,54	± 0,05	1,61	± 0,10	1,42	± 0,11
GABA	Apex	0,61	± 0,13	/	± /	/	± /
	Axes II	/	± /	3,04	± 1,34	1,65	± 0,93
	Feuilles	0,33	± 0,03	0,87	± 0,30	0,50	± 0,17
	Tige	0,38	± 0,07	2,64	± 1,14	0,45	± 0,08
	Racines	2,60	± 0,32	5,79	± 0,72	2,00	± 0,10
Proline	Apex	1,13	± 0,23	/	± /	/	± /
	Axes II	/	± /	30,01	± 9,03	2,11	± 0,44
	Feuilles	0,65	± 0,14	10,59	± 1,90	1,85	± 0,25
	Tige	0,72	± 0,21	22,39	± 4,42	1,19	± 0,20
	Racines	0,43	± 0,02	6,53	± 1,46	1,31	± 0,14

		N12								
		J+0			J+7			J+14		
Méthylcystéine	Apex	0,04	±	0,00	/	±	/	/	±	/
	Axes II	/	±	/	0,27	±	0,12	0,13	±	0,05
	Feuilles	0,15	±	0,13	0,55	±	0,31	0,28	±	0,15
	Tige	0,12	±	0,03	0,21	±	0,11	0,11	±	0,08
	Racines	0,05	±	0,02	0,09	±	0,01	0,05	±	0,00
Ornithine	Apex	0,05	±	0,01	/	±	/	/	±	/
	Axes II	/	±	/	0,16	±	0,05	0,12	±	0,03
	Feuilles	0,17	±	0,02	0,25	±	0,02	0,17	±	0,02
	Tige	0,15	±	0,04	0,48	±	0,10	0,16	±	0,03
	Racines	0,04	±	0,01	0,09	±	0,04	0,08	±	0,02
Cystine	Apex	0,03	±	0,01	/	±	/	/	±	/
	Axes II	/	±	/	0,03	±	0,01	0,09	±	0,01
	Feuilles	0,06	±	0,02	0,08	±	0,03	0,04	±	0,01
	Tige	0,24	±	0,12	0,13	±	0,05	0,20	±	0,15
	Racines	0,06	±	0,01	0,05	±	0,01	0,05	±	0,02
Lysine	Apex	0,58	±	0,11	/	±	/	/	±	/
	Axes II	/	±	/	1,43	±	0,31	1,01	±	0,21
	Feuilles	0,47	±	0,06	0,26	±	0,02	0,67	±	0,03
	Tige	0,35	±	0,09	0,66	±	0,15	0,41	±	0,07
	Racines	0,27	±	0,05	0,53	±	0,04	0,48	±	0,02
Tyrosine	Apex	0,31	±	0,03	/	±	/	/	±	/
	Axes II	/	±	/	0,35	±	0,17	0,42	±	0,24
	Feuilles	0,23	±	0,08	0,08	±	0,02	0,15	±	0,07
	Tige	0,25	±	0,14	0,12	±	0,01	0,20	±	0,03
	Racines	0,05	±	0,02	0,09	±	0,01	0,13	±	0,02
Méthionine	Apex	0,24	±	0,04	/	±	/	/	±	/
	Axes II	/	±	/	0,19	±	0,05	0,37	±	0,14
	Feuilles	0,21	±	0,08	0,17	±	0,05	0,18	±	0,01
	Tige	0,16	±	0,12	0,16	±	0,05	0,45	±	0,31
	Racines	0,32	±	0,08	0,15	±	0,08	0,17	±	0,01
Valine	Apex	9,84	±	1,51	/	±	/	/	±	/
	Axes II	/	±	/	11,14	±	5,60	6,93	±	7,28
	Feuilles	5,18	±	2,58	4,27	±	2,33	3,53	±	1,92
	Tige	7,16	±	0,99	3,91	±	0,86	3,56	±	1,81
	Racines	11,00	±	1,81	11,46	±	1,40	8,48	±	0,32
Isoleucine	Apex	0,53	±	0,02	/	±	/	/	±	/
	Axes II	/	±	/	1,07	±	0,27	0,69	±	0,19
	Feuilles	0,59	±	0,29	0,76	±	0,04	0,82	±	0,05
	Tige	0,26	±	0,08	0,23	±	0,05	0,43	±	0,06
	Racines	0,43	±	0,04	0,77	±	0,02	1,00	±	0,01
Leucine	Apex	0,71	±	0,09	/	±	/	/	±	/
	Axes II	/	±	/	0,96	±	0,23	0,62	±	0,09
	Feuilles	0,23	±	0,03	0,23	±	0,02	0,37	±	0,02
	Tige	0,19	±	0,04	0,31	±	0,06	0,30	±	0,04
	Racines	0,31	±	0,06	0,42	±	0,06	0,49	±	0,07
Phénylalanine	Apex	0,31	±	0,04	/	±	/	/	±	/
	Axes II	/	±	/	0,73	±	0,19	0,49	±	0,08
	Feuilles	0,18	±	0,03	0,18	±	0,02	0,56	±	0,05
	Tige	0,16	±	0,01	0,14	±	0,02	0,21	±	0,04
	Racines	0,09	±	0,01	0,21	±	0,02	0,25	±	0,01
Tryptophane	Apex	0,29	±	0,04	/	±	/	/	±	/
	Axes II	/	±	/	0,72	±	0,26	0,62	±	0,07
	Feuilles	0,12	±	0,01	0,21	±	0,04	0,42	±	0,05
	Tige	0,15	±	0,04	0,14	±	0,05	0,23	±	0,07
	Racines	0,11	±	0,04	0,19	±	0,02	0,40	±	0,11

Annexe X : résultats des dosages des acides aminés dans les tissus en réponse au traitement N6N0N6.

		N6N0N6					
		J+0		J+7		J+14	
Hydroxyproline	Apex	0,15	± 0,10	/	± /	/	± /
	Axes II	/	± /	0,19	± 0,0	0,05	± 0,06
	Feuilles	0,01	± 0,02	0,02	± 0,0	0,00	± 0,00
	Tige	0,02	± 0,02	0,02	± 0,0	0,00	± 0,00
	Racines	0,00	± 0,00	0,00	± 0,0	0,00	± 0,00
Histidine	Apex	0,09	± 0,01	/	± /	/	± /
	Axes II	/	± /	0,63	± 0,4	0,38	± 0,28
	Feuilles	0,07	± 0,02	0,47	± 0,5	0,50	± 0,47
	Tige	0,06	± 0,03	0,55	± 0,3	0,77	± 0,22
	Racines	0,03	± 0,02	0,43	± 0,4	0,29	± 0,15
Sérine	Apex	1,20	± 0,50	/	± /	/	± /
	Axes II	/	± /	9,78	± 5,7	5,09	± 3,43
	Feuilles	0,54	± 0,13	6,20	± 5,8	15,99	± 6,77
	Tige	1,09	± 0,16	4,86	± 2,2	4,81	± 1,51
	Racines	0,84	± 0,06	3,34	± 2,3	3,54	± 1,34
Arginine	Apex	0,20	± 0,03	/	± /	/	± /
	Axes II	/	± /	1,03	± 0,3	1,18	± 0,52
	Feuilles	0,17	± 0,08	8,14	± 7,9	11,21	± 9,23
	Tige	0,34	± 0,18	12,25	± 5,5	21,97	± 6,62
	Racines	0,42	± 0,16	1,77	± 1,6	2,72	± 1,09
Glycine	Apex	0,14	± 0,07	/	± /	/	± /
	Axes II	/	± /	0,96	± 0,4	0,34	± 0,20
	Feuilles	0,16	± 0,07	0,24	± 0,1	0,27	± 0,13
	Tige	0,16	± 0,05	0,31	± 0,1	0,27	± 0,09
	Racines	0,21	± 0,04	0,47	± 0,2	0,32	± 0,16
Glutamate	Apex	3,78	± 1,17	/	± /	/	± /
	Axes II	/	± /	16,94	± 8,5	12,39	± 5,89
	Feuilles	4,46	± 0,25	15,63	± 7,3	20,06	± 5,82
	Tige	3,45	± 0,40	11,60	± 3,7	9,05	± 3,14
	Racines	4,34	± 0,42	7,96	± 3,7	6,61	± 2,02
Alanine	Apex	1,26	± 0,76	/	± /	/	± /
	Axes II	/	± /	7,24	± 3,3	4,18	± 2,23
	Feuilles	0,85	± 0,10	4,80	± 4,1	6,16	± 2,37
	Tige	0,75	± 0,22	3,60	± 1,3	2,23	± 0,66
	Racines	1,83	± 0,72	8,19	± 4,6	2,19	± 0,65
Thréonine	Apex	0,47	± 0,14	/	± /	/	± /
	Axes II	/	± /	1,56	± 0,5	1,38	± 0,66
	Feuilles	0,34	± 0,02	1,22	± 0,7	2,01	± 0,54
	Tige	0,45	± 0,06	1,41	± 0,4	1,89	± 0,57
	Racines	0,40	± 0,01	0,87	± 0,4	1,15	± 0,37
GABA	Apex	0,11	± 0,04	/	± /	/	± /
	Axes II	/	± /	2,00	± 1,0	1,29	± 1,41
	Feuilles	0,18	± 0,13	0,40	± 0,2	0,61	± 0,42
	Tige	0,33	± 0,22	1,44	± 1,1	1,16	± 0,73
	Racines	1,38	± 0,24	3,41	± 0,8	2,65	± 0,88
Proline	Apex	0,25	± 0,07	/	± /	/	± /
	Axes II	/	± /	21,91	± 10,1	2,39	± 2,25
	Feuilles	0,25	± 0,03	4,77	± 3,8	2,08	± 1,13
	Tige	0,34	± 0,05	14,40	± 5,7	4,32	± 2,37
	Racines	0,54	± 0,03	2,38	± 1,4	1,61	± 0,80

		N6NON6								
		J+0			J+7			J+14		
Méthylcystéine	Apex	0,07	±	0,02	/	±	/	/	±	/
	Axes II	/	±	/	0,23	±	0,0	0,15	±	0,07
	Feuilles	0,04	±	0,01	0,31	±	0,2	0,22	±	0,21
	Tige	0,08	±	0,03	0,11	±	0,1	0,12	±	0,04
	Racines	0,07	±	0,02	0,06	±	0,0	0,13	±	0,04
Ornithine	Apex	0,18	±	0,17	/	±	/	/	±	/
	Axes II	/	±	/	0,13	±	0,0	0,08	±	0,03
	Feuilles	0,08	±	0,03	0,28	±	0,2	0,21	±	0,05
	Tige	0,10	±	0,03	0,22	±	0,0	0,25	±	0,06
	Racines	0,05	±	0,01	0,09	±	0,0	0,08	±	0,03
Cystine	Apex	0,11	±	0,01	/	±	/	/	±	/
	Axes II	/	±	/	0,13	±	0,1	0,05	±	0,01
	Feuilles	0,04	±	0,01	0,03	±	0,0	0,08	±	0,05
	Tige	0,05	±	0,01	0,11	±	0,1	0,16	±	0,07
	Racines	0,05	±	0,02	0,10	±	0,0	0,10	±	0,06
Lysine	Apex	1,01	±	0,34	/	±	/	/	±	/
	Axes II	/	±	/	1,03	±	0,3	0,61	±	0,21
	Feuilles	0,41	±	0,03	0,35	±	0,2	0,54	±	0,15
	Tige	0,40	±	0,06	0,28	±	0,1	0,52	±	0,12
	Racines	0,30	±	0,01	0,30	±	0,1	0,56	±	0,16
Tyrosine	Apex	0,37	±	0,25	/	±	/	/	±	/
	Axes II	/	±	/	0,45	±	0,2	0,22	±	0,08
	Feuilles	0,23	±	0,02	0,25	±	0,0	0,12	±	0,03
	Tige	0,25	±	0,12	0,25	±	0,1	0,43	±	0,17
	Racines	0,08	±	0,02	0,12	±	0,0	0,14	±	0,03
Méthionine	Apex	0,27	±	0,03	/	±	/	/	±	/
	Axes II	/	±	/	0,19	±	0,1	0,27	±	0,07
	Feuilles	0,15	±	0,05	0,15	±	0,0	0,21	±	0,04
	Tige	0,09	±	0,03	0,24	±	0,1	0,49	±	0,23
	Racines	0,16	±	0,07	0,15	±	0,0	0,15	±	0,08
Valine	Apex	6,72	±	3,74	/	±	/	/	±	/
	Axes II	/	±	/	12,87	±	1,1	8,79	±	2,41
	Feuilles	3,32	±	1,68	5,34	±	1,4	6,84	±	1,62
	Tige	4,70	±	2,80	6,06	±	1,4	7,10	±	1,00
	Racines	11,93	±	0,40	9,73	±	2,1	16,44	±	4,69
Isoleucine	Apex	0,65	±	0,37	/	±	/	/	±	/
	Axes II	/	±	/	0,41	±	0,1	0,39	±	0,16
	Feuilles	0,46	±	0,35	0,34	±	0,2	0,44	±	0,06
	Tige	0,26	±	0,02	0,17	±	0,1	0,58	±	0,17
	Racines	0,57	±	0,05	0,52	±	0,1	1,32	±	0,42
Leucine	Apex	1,11	±	0,66	/	±	/	/	±	/
	Axes II	/	±	/	0,63	±	0,2	0,41	±	0,25
	Feuilles	0,37	±	0,18	0,19	±	0,1	0,34	±	0,08
	Tige	0,20	±	0,02	0,18	±	0,0	0,44	±	0,12
	Racines	0,21	±	0,05	0,34	±	0,1	0,67	±	0,26
Phénylalanine	Apex	0,31	±	0,15	/	±	/	/	±	/
	Axes II	/	±	/	0,42	±	0,2	0,30	±	0,12
	Feuilles	0,19	±	0,06	0,19	±	0,0	0,61	±	0,12
	Tige	0,13	±	0,01	0,13	±	0,0	0,41	±	0,11
	Racines	0,19	±	0,10	0,24	±	0,0	0,39	±	0,06
Tryptophane	Apex	0,87	±	0,64	/	±	/	/	±	/
	Axes II	/	±	/	0,34	±	0,1	0,72	±	0,40
	Feuilles	0,44	±	0,25	0,18	±	0,1	0,38	±	0,10
	Tige	0,33	±	0,20	0,11	±	0,0	0,50	±	0,30
	Racines	0,30	±	0,19	0,14	±	0,0	0,55	±	0,15

Annexe XI : résultats des dosages des acides aminés dans les tissus en réponse au traitement N6N0N0.

		N6N0N0					
		J+0		J+7		J+14	
Hydroxyproline	Apex	0,15 ± 0,10	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /
	Axes II	/ ± /	0,31 ± 0,28	0,13 ± 0,15	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Feuilles	0,01 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Tige	0,02 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Racines	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,02
Histidine	Apex	0,09 ± 0,01	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /
	Axes II	/ ± /	0,38 ± 0,33	0,04 ± 0,03	0,05 ± 0,03	0,05 ± 0,03	0,05 ± 0,03
	Feuilles	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,05	0,05 ± 0,03	0,05 ± 0,03	0,05 ± 0,03	0,05 ± 0,03
	Tige	0,06 ± 0,03	0,09 ± 0,07	0,05 ± 0,04	0,05 ± 0,04	0,05 ± 0,04	0,05 ± 0,04
	Racines	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,03	0,05 ± 0,04	0,05 ± 0,04	0,05 ± 0,04	0,05 ± 0,04
Sérine	Apex	1,20 ± 0,50	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /
	Axes II	/ ± /	2,05 ± 0,93	1,40 ± 0,08	0,54 ± 0,13	0,46 ± 0,15	0,62 ± 0,13
	Feuilles	0,54 ± 0,13	0,46 ± 0,15	0,62 ± 0,13	1,09 ± 0,16	1,31 ± 0,15	1,12 ± 0,24
	Tige	1,09 ± 0,16	1,31 ± 0,15	1,12 ± 0,24	0,84 ± 0,06	0,72 ± 0,04	0,91 ± 0,38
	Racines	0,84 ± 0,06	0,72 ± 0,04	0,91 ± 0,38	0,20 ± 0,03	/ ± /	/ ± /
Arginine	Apex	0,20 ± 0,03	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /
	Axes II	/ ± /	0,39 ± 0,01	0,48 ± 0,20	0,17 ± 0,08	0,16 ± 0,07	0,16 ± 0,06
	Feuilles	0,17 ± 0,08	0,16 ± 0,07	0,16 ± 0,06	0,34 ± 0,18	0,21 ± 0,08	0,27 ± 0,09
	Tige	0,34 ± 0,18	0,21 ± 0,08	0,27 ± 0,09	0,42 ± 0,16	0,23 ± 0,04	0,28 ± 0,08
	Racines	0,42 ± 0,16	0,23 ± 0,04	0,28 ± 0,08	0,14 ± 0,07	/ ± /	/ ± /
Glycine	Apex	0,14 ± 0,07	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /
	Axes II	/ ± /	0,25 ± 0,02	0,19 ± 0,11	0,16 ± 0,07	0,03 ± 0,03	0,12 ± 0,05
	Feuilles	0,16 ± 0,07	0,03 ± 0,03	0,12 ± 0,05	0,16 ± 0,05	0,11 ± 0,03	0,10 ± 0,04
	Tige	0,16 ± 0,05	0,11 ± 0,03	0,10 ± 0,04	0,21 ± 0,04	0,18 ± 0,03	0,21 ± 0,17
	Racines	0,21 ± 0,04	0,18 ± 0,03	0,21 ± 0,17	3,78 ± 1,17	/ ± /	/ ± /
Glutamate	Apex	3,78 ± 1,17	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /
	Axes II	/ ± /	5,35 ± 1,67	4,04 ± 0,40	4,46 ± 0,25	4,14 ± 1,48	4,45 ± 1,55
	Feuilles	4,46 ± 0,25	4,14 ± 1,48	4,45 ± 1,55	3,45 ± 0,40	5,25 ± 1,51	7,60 ± 2,40
	Tige	3,45 ± 0,40	5,25 ± 1,51	7,60 ± 2,40	4,34 ± 0,42	3,35 ± 0,62	3,69 ± 1,35
	Racines	4,34 ± 0,42	3,35 ± 0,62	3,69 ± 1,35	1,26 ± 0,76	/ ± /	/ ± /
Alanine	Apex	1,26 ± 0,76	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /
	Axes II	/ ± /	1,79 ± 0,60	1,47 ± 0,43	0,85 ± 0,10	1,13 ± 0,36	0,57 ± 0,26
	Feuilles	0,85 ± 0,10	1,13 ± 0,36	0,57 ± 0,26	0,75 ± 0,22	1,37 ± 0,34	1,30 ± 0,52
	Tige	0,75 ± 0,22	1,37 ± 0,34	1,30 ± 0,52	1,83 ± 0,72	1,67 ± 0,81	1,64 ± 0,98
	Racines	1,83 ± 0,72	1,67 ± 0,81	1,64 ± 0,98	0,47 ± 0,14	/ ± /	/ ± /
Thréonine	Apex	0,47 ± 0,14	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /
	Axes II	/ ± /	0,82 ± 0,05	0,37 ± 0,03	0,34 ± 0,02	0,31 ± 0,00	0,33 ± 0,11
	Feuilles	0,34 ± 0,02	0,31 ± 0,00	0,33 ± 0,11	0,45 ± 0,06	0,58 ± 0,05	0,42 ± 0,09
	Tige	0,45 ± 0,06	0,58 ± 0,05	0,42 ± 0,09	0,40 ± 0,01	0,32 ± 0,04	0,34 ± 0,15
	Racines	0,40 ± 0,01	0,32 ± 0,04	0,34 ± 0,15	0,11 ± 0,04	/ ± /	/ ± /
GABA	Apex	0,11 ± 0,04	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /
	Axes II	/ ± /	1,07 ± 0,11	0,51 ± 0,28	0,18 ± 0,13	0,16 ± 0,07	0,11 ± 0,05
	Feuilles	0,18 ± 0,13	0,16 ± 0,07	0,11 ± 0,05	0,33 ± 0,22	0,65 ± 0,38	0,55 ± 0,37
	Tige	0,33 ± 0,22	0,65 ± 0,38	0,55 ± 0,37	1,38 ± 0,24	0,99 ± 0,18	0,65 ± 0,12
	Racines	1,38 ± 0,24	0,99 ± 0,18	0,65 ± 0,12	0,25 ± 0,07	/ ± /	/ ± /
Proline	Apex	0,25 ± 0,07	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /
	Axes II	/ ± /	2,96 ± 1,60	1,33 ± 0,36	0,25 ± 0,03	0,37 ± 0,10	0,36 ± 0,13
	Feuilles	0,25 ± 0,03	0,37 ± 0,10	0,36 ± 0,13	0,34 ± 0,05	0,86 ± 0,30	1,42 ± 1,01
	Tige	0,34 ± 0,05	0,86 ± 0,30	1,42 ± 1,01	0,54 ± 0,03	0,50 ± 0,11	0,49 ± 0,14
	Racines	0,54 ± 0,03	0,50 ± 0,11	0,49 ± 0,14			

		N6N0N0					
		J+0		J+7		J+14	
Méthylcystéine	Apex	0,07 ± 0,02	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /
	Axes II	/ ± /	0,35 ± 0,10	0,18 ± 0,00	0,18 ± 0,00	0,18 ± 0,00	0,18 ± 0,00
	Feuilles	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,07 ± 0,04	0,07 ± 0,04	0,07 ± 0,04	0,07 ± 0,04
	Tige	0,08 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,04	0,09 ± 0,04	0,09 ± 0,04	0,09 ± 0,04
	Racines	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,10 ± 0,03	0,10 ± 0,03	0,10 ± 0,03	0,10 ± 0,03
Ornithine	Apex	0,18 ± 0,17	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /
	Axes II	/ ± /	0,11 ± 0,02	0,17 ± 0,04	0,17 ± 0,04	0,17 ± 0,04	0,17 ± 0,04
	Feuilles	0,08 ± 0,03	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,03	0,15 ± 0,03	0,15 ± 0,03	0,15 ± 0,03
	Tige	0,10 ± 0,03	0,18 ± 0,03	0,21 ± 0,05	0,21 ± 0,05	0,21 ± 0,05	0,21 ± 0,05
	Racines	0,05 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,18 ± 0,09	0,18 ± 0,09	0,18 ± 0,09	0,18 ± 0,09
Cystine	Apex	0,11 ± 0,01	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /
	Axes II	/ ± /	0,05 ± 0,01	0,16 ± 0,08	0,16 ± 0,08	0,16 ± 0,08	0,16 ± 0,08
	Feuilles	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01
	Tige	0,05 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,33 ± 0,16	0,33 ± 0,16	0,33 ± 0,16	0,33 ± 0,16
	Racines	0,05 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,39 ± 0,25	0,39 ± 0,25	0,39 ± 0,25	0,39 ± 0,25
Lysine	Apex	1,01 ± 0,34	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /
	Axes II	/ ± /	0,80 ± 0,31	0,51 ± 0,24	0,51 ± 0,24	0,51 ± 0,24	0,51 ± 0,24
	Feuilles	0,41 ± 0,03	0,28 ± 0,09	0,21 ± 0,07	0,21 ± 0,07	0,21 ± 0,07	0,21 ± 0,07
	Tige	0,40 ± 0,06	0,20 ± 0,02	0,16 ± 0,04	0,16 ± 0,04	0,16 ± 0,04	0,16 ± 0,04
	Racines	0,30 ± 0,01	0,24 ± 0,03	0,27 ± 0,05	0,27 ± 0,05	0,27 ± 0,05	0,27 ± 0,05
Tyrosine	Apex	0,37 ± 0,25	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /
	Axes II	/ ± /	0,18 ± 0,10	0,10 ± 0,09	0,10 ± 0,09	0,10 ± 0,09	0,10 ± 0,09
	Feuilles	0,23 ± 0,02	0,34 ± 0,03	0,28 ± 0,10	0,28 ± 0,10	0,28 ± 0,10	0,28 ± 0,10
	Tige	0,25 ± 0,12	0,08 ± 0,02	0,16 ± 0,11	0,16 ± 0,11	0,16 ± 0,11	0,16 ± 0,11
	Racines	0,08 ± 0,02	0,19 ± 0,08	0,17 ± 0,08	0,17 ± 0,08	0,17 ± 0,08	0,17 ± 0,08
Méthionine	Apex	0,27 ± 0,03	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /
	Axes II	/ ± /	0,21 ± 0,04	0,18 ± 0,05	0,18 ± 0,05	0,18 ± 0,05	0,18 ± 0,05
	Feuilles	0,15 ± 0,05	0,26 ± 0,03	0,19 ± 0,14	0,19 ± 0,14	0,19 ± 0,14	0,19 ± 0,14
	Tige	0,09 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,16 ± 0,09	0,16 ± 0,09	0,16 ± 0,09	0,16 ± 0,09
	Racines	0,16 ± 0,07	0,17 ± 0,14	0,43 ± 0,40	0,43 ± 0,40	0,43 ± 0,40	0,43 ± 0,40
Valine	Apex	6,72 ± 3,74	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /
	Axes II	/ ± /	12,03 ± 2,48	7,59 ± 4,57	7,59 ± 4,57	7,59 ± 4,57	7,59 ± 4,57
	Feuilles	3,32 ± 1,68	5,47 ± 0,11	4,45 ± 1,33	4,45 ± 1,33	4,45 ± 1,33	4,45 ± 1,33
	Tige	4,70 ± 2,80	4,72 ± 0,76	4,75 ± 0,96	4,75 ± 0,96	4,75 ± 0,96	4,75 ± 0,96
	Racines	11,93 ± 0,40	9,92 ± 1,13	11,94 ± 0,95	11,94 ± 0,95	11,94 ± 0,95	11,94 ± 0,95
Isoleucine	Apex	0,65 ± 0,37	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /
	Axes II	/ ± /	0,24 ± 0,06	0,32 ± 0,13	0,32 ± 0,13	0,32 ± 0,13	0,32 ± 0,13
	Feuilles	0,46 ± 0,35	0,10 ± 0,01	0,82 ± 0,28	0,82 ± 0,28	0,82 ± 0,28	0,82 ± 0,28
	Tige	0,26 ± 0,02	0,14 ± 0,07	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,02
	Racines	0,57 ± 0,05	0,40 ± 0,01	0,50 ± 0,12	0,50 ± 0,12	0,50 ± 0,12	0,50 ± 0,12
Leucine	Apex	1,11 ± 0,66	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /
	Axes II	/ ± /	0,21 ± 0,05	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,01
	Feuilles	0,37 ± 0,18	0,14 ± 0,05	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,02
	Tige	0,20 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,02
	Racines	0,21 ± 0,05	0,26 ± 0,05	0,15 ± 0,08	0,15 ± 0,08	0,15 ± 0,08	0,15 ± 0,08
Phénylalanine	Apex	0,31 ± 0,15	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /
	Axes II	/ ± /	0,15 ± 0,01	0,11 ± 0,07	0,11 ± 0,07	0,11 ± 0,07	0,11 ± 0,07
	Feuilles	0,19 ± 0,06	0,12 ± 0,02	0,11 ± 0,04	0,11 ± 0,04	0,11 ± 0,04	0,11 ± 0,04
	Tige	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,05	0,13 ± 0,05	0,13 ± 0,05	0,13 ± 0,05
	Racines	0,19 ± 0,10	0,14 ± 0,06	0,16 ± 0,07	0,16 ± 0,07	0,16 ± 0,07	0,16 ± 0,07
Tryptophane	Apex	0,87 ± 0,64	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /	/ ± /
	Axes II	/ ± /	0,40 ± 0,17	0,38 ± 0,31	0,38 ± 0,31	0,38 ± 0,31	0,38 ± 0,31
	Feuilles	0,44 ± 0,25	0,28 ± 0,07	0,52 ± 0,15	0,52 ± 0,15	0,52 ± 0,15	0,52 ± 0,15
	Tige	0,33 ± 0,20	1,50 ± 1,17	0,62 ± 0,51	0,62 ± 0,51	0,62 ± 0,51	0,62 ± 0,51
	Racines	0,30 ± 0,19	0,15 ± 0,02	0,25 ± 0,16	0,25 ± 0,16	0,25 ± 0,16	0,25 ± 0,16

Annexe XII : résultats des dosages des acides aminés dans les tissus en réponse au traitement N2N0N2.

		N2N0N2					
		J+0		J+7		J+14	
Hydroxyproline	Apex	0,23 ± 0,10	/	/	/	/	
	Axes II	/	/	0,35 ± 0,35	0,33	0,20	
	Feuilles	0,02 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,00	0,00	0,00	
	Tige	0,03 ± 0,04	0,03 ± 0,03	0,01	0,01	0,01	
	Racines	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00	0,00	0,00	
Histidine	Apex	0,12 ± 0,10	/	/	/	/	
	Axes II	/	/	0,25 ± 0,21	0,19 ± 0,11		
	Feuilles	0,08 ± 0,04	0,06 ± 0,06	0,00	0,00	0,00	
	Tige	0,10 ± 0,06	0,19 ± 0,06	0,14 ± 0,06			
	Racines	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,03	0,10 ± 0,01			
Sérine	Apex	0,85 ± 0,12	/	/	/	/	
	Axes II	/	/	4,13 ± 2,59	3,44 ± 0,77		
	Feuilles	0,58 ± 0,29	1,88 ± 1,33	2,43 ± 1,89			
	Tige	0,91 ± 0,35	2,85 ± 0,92	2,14 ± 0,54			
	Racines	0,74 ± 0,08	1,03 ± 0,16	0,94 ± 0,26			
Arginine	Apex	0,16 ± 0,12	/	/	/	/	
	Axes II	/	/	1,03 ± 0,35	0,59 ± 0,03		
	Feuilles	0,22 ± 0,12	0,79 ± 0,70	0,60 ± 0,47			
	Tige	0,75 ± 0,63	1,79 ± 1,31	3,93 ± 2,77			
	Racines	0,32 ± 0,21	0,35 ± 0,10	0,33 ± 0,03			
Glycine	Apex	0,10 ± 0,03	/	/	/	/	
	Axes II	/		0,37 ± 0,20	0,28 ± 0,08		
	Feuilles	0,15 ± 0,09	0,07 ± 0,01	0,24 ± 0,17			
	Tige	0,17 ± 0,06	0,33 ± 0,13	0,12 ± 0,04			
	Racines	0,13 ± 0,06	0,14 ± 0,05	0,19 ± 0,12			
Glutamate	Apex	2,69 ± 0,21	/	/	/	/	
	Axes II	/	/	8,86 ± 4,50	10,33 ± 2,39		
	Feuilles	3,24 ± 0,98	9,78 ± 4,07	7,93 ± 3,44			
	Tige	3,87 ± 1,31	9,58 ± 2,11	7,49 ± 1,84			
	Racines	4,02 ± 0,82	5,04 ± 1,57	3,90 ± 0,12			
Alanine	Apex	1,74 ± 0,86	/	/	/	/	
	Axes II	/	/	3,47 ± 1,80	2,62 ± 0,68		
	Feuilles	0,76 ± 0,12	2,02 ± 0,89	1,86 ± 1,02			
	Tige	0,87 ± 0,30	3,06 ± 0,61	1,75 ± 0,30			
	Racines	1,70 ± 1,12	3,14 ± 0,20	1,80 ± 0,53			
Thréonine	Apex	0,35 ± 0,01	/	/	/	/	
	Axes II	/	/	0,80 ± 0,25	0,90 ± 0,16		
	Feuilles	0,34 ± 0,10	0,44 ± 0,16	0,52 ± 0,26			
	Tige	0,44 ± 0,14	0,73 ± 0,15	0,91 ± 0,26			
	Racines	0,37 ± 0,06	0,35 ± 0,06	0,43 ± 0,03			
GABA	Apex	0,15 ± 0,05	/	/	/	/	
	Axes II	/	/	2,02 ± 0,95	0,74 ± 0,71		
	Feuilles	0,11 ± 0,03	0,19 ± 0,05	0,08 ± 0,07			
	Tige	0,36 ± 0,24	1,65 ± 0,96	1,07 ± 0,80			
	Racines	2,03 ± 1,22	2,16 ± 0,04	1,51 ± 0,26			
Proline	Apex	0,32 ± 0,02	/	/	/	/	
	Axes II	/	/	6,67 ± 3,46	1,85 ± 1,08		
	Feuilles	0,22 ± 0,01	0,99 ± 0,59	0,77 ± 0,33			
	Tige	0,28 ± 0,09	4,56 ± 1,52	4,05 ± 1,84			
	Racines	0,48 ± 0,10	0,61 ± 0,07	0,98 ± 0,37			

		N2N0N2					
		J+0		J+7		J+14	
Méthylcystéine	Apex	0,14 ± 0,05	/	/	/	/	/
	Axes II	/	/	0,16 ± 0,12	0,19 ± 0,03		
	Feuilles	0,04 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,16 ± 0,11		
	Tige	0,08 ± 0,03	0,08 ± 0,04	0,08 ± 0,04	0,08 ± 0,03		
	Racines	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,09 ± 0,05		
Ornithine	Apex	0,07 ± 0,02	/	/	/	/	/
	Axes II	/	/	0,13 ± 0,01	0,09 ± 0,03		
	Feuilles	0,12 ± 0,02	0,20 ± 0,07	0,20 ± 0,07	0,14 ± 0,02		
	Tige	0,13 ± 0,04	0,12 ± 0,05	0,12 ± 0,05	0,23 ± 0,06		
	Racines	0,09 ± 0,05	0,07 ± 0,03	0,07 ± 0,03	0,13 ± 0,03		
Cystine	Apex	0,16 ± 0,08	/	/	/	/	/
	Axes II	/	/	0,12 ± 0,03	0,14 ± 0,03		
	Feuilles	0,06 ± 0,03	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,01		
	Tige	0,13 ± 0,08	0,15 ± 0,07	0,15 ± 0,07	0,38 ± 0,28		
	Racines	0,12 ± 0,04	0,09 ± 0,03	0,09 ± 0,03	0,24 ± 0,03		
Lysine	Apex	1,35 ± 0,32	/	/	/	/	/
	Axes II	/	/	0,64 ± 0,50	1,33 ± 0,28		
	Feuilles	0,40 ± 0,19	0,33 ± 0,20	0,33 ± 0,20	0,30 ± 0,10		
	Tige	0,52 ± 0,27	0,39 ± 0,18	0,39 ± 0,18	0,31 ± 0,09		
	Racines	0,25 ± 0,03	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,29 ± 0,00		
Tyrosine	Apex	0,57 ± 0,20	/	/	/	/	/
	Axes II	/	/	0,12 ± 0,07	0,14 ± 0,06		
	Feuilles	0,16 ± 0,14	0,34 ± 0,07	0,34 ± 0,07	0,30 ± 0,09		
	Tige	0,21 ± 0,13	0,23 ± 0,13	0,23 ± 0,13	0,21 ± 0,03		
	Racines	0,07 ± 0,03	0,09 ± 0,05	0,09 ± 0,05	0,07 ± 0,02		
Méthionine	Apex	0,53 ± 0,11	/	/	/	/	/
	Axes II	/	/	0,16 ± 0,11	0,18 ± 0,04		
	Feuilles	0,18 ± 0,07	0,21 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,24 ± 0,05		
	Tige	0,28 ± 0,21	0,18 ± 0,07	0,18 ± 0,07	0,06 ± 0,02		
	Racines	0,19 ± 0,05	0,23 ± 0,06	0,23 ± 0,06	0,20 ± 0,13		
Valine	Apex	8,73 ± 3,83	/	/	/	/	/
	Axes II	/	/	9,36 ± 5,30	14,77 ± 1,69		
	Feuilles	5,20 ± 2,03	5,57 ± 1,31	5,57 ± 1,31	4,84 ± 0,99		
	Tige	7,51 ± 3,12	8,09 ± 2,55	8,09 ± 2,55	5,78 ± 1,92		
	Racines	11,53 ± 2,03	10,62 ± 0,02	10,62 ± 0,02	9,83 ± 1,69		
Isoleucine	Apex	1,10 ± 0,26	/	/	/	/	/
	Axes II	/	/	0,18 ± 0,08	0,64 ± 0,12		
	Feuilles	0,19 ± 0,08	0,75 ± 0,19	0,75 ± 0,19	0,44 ± 0,43		
	Tige	0,28 ± 0,07	0,22 ± 0,10	0,22 ± 0,10	0,32 ± 0,15		
	Racines	0,58 ± 0,02	0,39 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,43 ± 0,18		
Leucine	Apex	1,45 ± 0,25	/	/	/	/	/
	Axes II	/	/	0,19 ± 0,11	0,91 ± 0,17		
	Feuilles	0,16 ± 0,06	0,20 ± 0,05	0,20 ± 0,05	0,15 ± 0,05		
	Tige	0,19 ± 0,03	0,22 ± 0,09	0,22 ± 0,09	0,25 ± 0,07		
	Racines	0,42 ± 0,05	0,24 ± 0,03	0,24 ± 0,03	0,17 ± 0,00		
Phénylalanine	Apex	0,42 ± 0,06	/	/	/	/	/
	Axes II	/	/	0,22 ± 0,12	0,37 ± 0,06		
	Feuilles	0,12 ± 0,04	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,14 ± 0,04		
	Tige	0,12 ± 0,05	0,16 ± 0,05	0,16 ± 0,05	0,16 ± 0,05		
	Racines	0,23 ± 0,15	0,22 ± 0,06	0,22 ± 0,06	0,22 ± 0,05		
Tryptophane	Apex	1,25 ± 0,92	/	/	/	/	/
	Axes II	/	/	0,17 ± 0,11	0,65 ± 0,28		
	Feuilles	0,42 ± 0,35	0,19 ± 0,07	0,19 ± 0,07	0,29 ± 0,12		
	Tige	0,45 ± 0,30	0,10 ± 0,04	0,10 ± 0,04	0,26 ± 0,12		
	Racines	0,38 ± 0,19	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,13 ± 0,03		

Annexe XIII : résultats des dosages des acides aminés au sommet et à la base de la tige en réponse au traitement N12.

		N12		
		J+0	J+7	J+14
Hydroxyproline	Tige du sommet	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Tige de la base	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,03
Histidine	Tige du sommet	0,20 ± 0,09	1,91 ± 0,19	0,62 ± 0,09
	Tige de la base	0,23 ± 0,19	1,53 ± 0,55	0,32 ± 0,18
Sérine	Tige du sommet	4,21 ± 0,41	9,64 ± 1,00	2,35 ± 0,11
	Tige de la base	1,83 ± 0,49	7,64 ± 5,51	2,49 ± 0,58
Arginine	Tige du sommet	0,43 ± 0,12	40,00 ± 3,12	5,98 ± 0,23
	Tige de la base	5,35 ± 6,06	43,86 ± 28,67	8,68 ± 6,03
Glycine	Tige du sommet	0,42 ± 0,05	0,29 ± 0,10	0,20 ± 0,00
	Tige de la base	0,13 ± 0,05	0,31 ± 0,14	0,27 ± 0,17
Glutamate	Tige du sommet	9,76 ± 0,79	18,25 ± 1,93	8,84 ± 1,10
	Tige de la base	7,29 ± 1,38	18,95 ± 7,65	7,52 ± 1,76
Alanine	Tige du sommet	2,67 ± 0,17	5,24 ± 0,46	1,56 ± 0,14
	Tige de la base	1,84 ± 0,30	5,84 ± 2,10	1,80 ± 0,72
Thréonine	Tige du sommet	1,67 ± 0,13	2,23 ± 0,17	1,00 ± 0,00
	Tige de la base	0,92 ± 0,31	2,61 ± 0,80	1,09 ± 0,20
GABA	Tige du sommet	0,40 ± 0,06	1,55 ± 0,66	0,53 ± 0,04
	Tige de la base	0,36 ± 0,07	3,72 ± 1,62	0,37 ± 0,12
Proline	Tige du sommet	0,74 ± 0,02	21,08 ± 2,04	1,32 ± 0,02
	Tige de la base	0,71 ± 0,41	23,69 ± 6,80	1,06 ± 0,37
Méthylcystéine	Tige du sommet	0,14 ± 0,02	0,27 ± 0,14	0,14 ± 0,11
	Tige de la base	0,09 ± 0,04	0,15 ± 0,08	0,08 ± 0,04
Ornithine	Tige du sommet	0,12 ± 0,02	0,39 ± 0,04	0,15 ± 0,00
	Tige de la base	0,17 ± 0,05	0,57 ± 0,16	0,17 ± 0,06
Cystine	Tige du sommet	0,25 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,12 ± 0,01
	Tige de la base	0,23 ± 0,24	0,17 ± 0,09	0,28 ± 0,30
Lysine	Tige du sommet	0,32 ± 0,04	0,48 ± 0,04	0,44 ± 0,04
	Tige de la base	0,38 ± 0,14	0,84 ± 0,27	0,37 ± 0,10
Tyrosine	Tige du sommet	0,31 ± 0,16	0,09 ± 0,00	0,32 ± 0,03
	Tige de la base	0,19 ± 0,12	0,15 ± 0,03	0,08 ± 0,02
Méthionine	Tige du sommet	0,24 ± 0,21	0,17 ± 0,03	0,08 ± 0,02
	Tige de la base	0,08 ± 0,03	0,15 ± 0,07	0,82 ± 0,61
Valine	Tige du sommet	7,47 ± 0,55	4,95 ± 0,14	3,26 ± 0,16
	Tige de la base	6,85 ± 1,43	2,86 ± 1,58	3,86 ± 3,45
Isoleucine	Tige du sommet	0,25 ± 0,03	0,22 ± 0,02	0,49 ± 0,00
	Tige de la base	0,28 ± 0,13	0,24 ± 0,07	0,37 ± 0,12
Leucine	Tige du sommet	0,19 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,32 ± 0,03
	Tige de la base	0,20 ± 0,07	0,35 ± 0,11	0,27 ± 0,06
Phénylalanine	Tige du sommet	0,21 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,28 ± 0,05
	Tige de la base	0,11 ± 0,02	0,14 ± 0,04	0,13 ± 0,03
Tryptophane	Tige du sommet	0,18 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,29 ± 0,10
	Tige de la base	0,11 ± 0,05	0,17 ± 0,07	0,16 ± 0,03

Annexe XIV résultats des dosages des acides aminés au sommet et à la base de la tige en réponse au traitement N6N0N6.

		N6N0N6		
		J+0	J+7	J+14
Hydroxyproline	Tige du sommet	0,04 ± 0,03	0,04 ± 0,04	0,00 ± 0,00
	Tige de la base	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Histidine	Tige du sommet	0,07 ± 0,06	0,50 ± 0,34	0,72 ± 0,20
	Tige de la base	0,05 ± 0,01	0,60 ± 0,30	0,83 ± 0,23
Sérine	Tige du sommet	1,40 ± 0,18	6,01 ± 3,09	5,23 ± 1,60
	Tige de la base	0,77 ± 0,13	3,71 ± 1,26	4,40 ± 1,43
Arginine	Tige du sommet	0,41 ± 0,25	5,88 ± 2,67	14,20 ± 4,05
	Tige de la base	0,26 ± 0,12	18,62 ± 8,31	29,75 ± 9,18
Glycine	Tige du sommet	0,22 ± 0,09	0,41 ± 0,22	0,33 ± 0,08
	Tige de la base	0,10 ± 0,01	0,20 ± 0,08	0,21 ± 0,10
Glutamate	Tige du sommet	4,18 ± 0,34	12,61 ± 4,45	10,83 ± 3,63
	Tige de la base	2,72 ± 0,45	10,59 ± 3,05	7,28 ± 2,65
Alanine	Tige du sommet	0,93 ± 0,28	4,20 ± 1,88	2,65 ± 0,66
	Tige de la base	0,57 ± 0,15	3,01 ± 0,69	1,80 ± 0,66
Thréonine	Tige du sommet	0,53 ± 0,06	1,54 ± 0,57	1,98 ± 0,53
	Tige de la base	0,38 ± 0,05	1,28 ± 0,28	1,80 ± 0,61
GABA	Tige du sommet	0,39 ± 0,31	1,12 ± 0,92	1,42 ± 1,07
	Tige de la base	0,26 ± 0,14	1,76 ± 1,36	0,91 ± 0,39
Proline	Tige du sommet	0,36 ± 0,05	14,04 ± 5,14	4,47 ± 2,42
	Tige de la base	0,31 ± 0,05	14,76 ± 6,17	4,17 ± 2,33
Méthylcystéine	Tige du sommet	0,11 ± 0,04	0,09 ± 0,05	0,14 ± 0,06
	Tige de la base	0,04 ± 0,01	0,13 ± 0,07	0,10 ± 0,01
Ornithine	Tige du sommet	0,07 ± 0,06	0,17 ± 0,05	0,23 ± 0,06
	Tige de la base	0,13 ± 0,01	0,26 ± 0,04	0,27 ± 0,05
Cystine	Tige du sommet	0,03 ± 0,00	0,12 ± 0,11	0,19 ± 0,07
	Tige de la base	0,06 ± 0,01	0,10 ± 0,04	0,13 ± 0,07
Lysine	Tige du sommet	0,52 ± 0,10	0,28 ± 0,15	0,49 ± 0,11
	Tige de la base	0,28 ± 0,02	0,27 ± 0,06	0,55 ± 0,14
Tyrosine	Tige du sommet	0,43 ± 0,24	0,35 ± 0,22	0,50 ± 0,19
	Tige de la base	0,06 ± 0,01	0,14 ± 0,06	0,36 ± 0,15
Méthionine	Tige du sommet	0,11 ± 0,04	0,06 ± 0,01	0,43 ± 0,20
	Tige de la base	0,07 ± 0,03	0,42 ± 0,20	0,54 ± 0,27
Valine	Tige du sommet	5,38 ± 3,20	7,34 ± 2,07	7,82 ± 1,56
	Tige de la base	4,03 ± 2,40	4,77 ± 0,74	6,38 ± 0,45
Isoleucine	Tige du sommet	0,30 ± 0,02	0,19 ± 0,10	0,73 ± 0,21
	Tige de la base	0,22 ± 0,03	0,16 ± 0,04	0,44 ± 0,14
Leucine	Tige du sommet	0,22 ± 0,02	0,16 ± 0,05	0,47 ± 0,11
	Tige de la base	0,19 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,41 ± 0,12
Phénylalanine	Tige du sommet	0,16 ± 0,03	0,14 ± 0,05	0,45 ± 0,10
	Tige de la base	0,09 ± 0,00	0,12 ± 0,02	0,38 ± 0,11
Tryptophane	Tige du sommet	0,41 ± 0,23	0,12 ± 0,06	0,56 ± 0,36
	Tige de la base	0,25 ± 0,17	0,11 ± 0,03	0,44 ± 0,23

Annexe XV : résultats des dosages des acides aminés au sommet et à la base de la tige en réponse au traitement N6N0N0.

		N6N0N0		
		J+0	J+7	J+14
Hydroxyproline	Tige du sommet	0,04 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Tige de la base	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Histidine	Tige du sommet	0,07 ± 0,06	0,09 ± 0,09	0,04 ± 0,02
	Tige de la base	0,05 ± 0,01	0,09 ± 0,05	0,07 ± 0,06
Sérine	Tige du sommet	1,40 ± 0,18	1,66 ± 0,27	1,14 ± 0,06
	Tige de la base	0,77 ± 0,13	0,96 ± 0,03	1,11 ± 0,43
Arginine	Tige du sommet	0,41 ± 0,25	0,21 ± 0,07	0,20 ± 0,02
	Tige de la base	0,26 ± 0,12	0,20 ± 0,10	0,35 ± 0,16
Glycine	Tige du sommet	0,22 ± 0,09	0,13 ± 0,05	0,10 ± 0,04
	Tige de la base	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,04
Glutamate	Tige du sommet	4,18 ± 0,34	6,10 ± 1,91	5,09 ± 0,67
	Tige de la base	2,72 ± 0,45	4,41 ± 1,11	10,11 ± 4,14
Alanine	Tige du sommet	0,93 ± 0,28	1,67 ± 0,48	1,26 ± 0,43
	Tige de la base	0,57 ± 0,15	1,07 ± 0,21	1,35 ± 0,61
Thréonine	Tige du sommet	0,53 ± 0,06	0,72 ± 0,10	0,41 ± 0,02
	Tige de la base	0,38 ± 0,05	0,44 ± 0,01	0,43 ± 0,16
GABA	Tige du sommet	0,39 ± 0,31	0,72 ± 0,40	0,49 ± 0,40
	Tige de la base	0,26 ± 0,14	0,59 ± 0,37	0,61 ± 0,34
Proline	Tige du sommet	0,36 ± 0,05	0,98 ± 0,36	0,66 ± 0,30
	Tige de la base	0,31 ± 0,05	0,73 ± 0,24	2,18 ± 1,72
Méthylcystéine	Tige du sommet	0,11 ± 0,04	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,03
	Tige de la base	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,08 ± 0,05
Ornithine	Tige du sommet	0,07 ± 0,06	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,01
	Tige de la base	0,13 ± 0,01	0,21 ± 0,04	0,26 ± 0,09
Cystine	Tige du sommet	0,03 ± 0,00	0,11 ± 0,02	0,37 ± 0,21
	Tige de la base	0,06 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,29 ± 0,11
Lysine	Tige du sommet	0,52 ± 0,10	0,19 ± 0,03	0,14 ± 0,02
	Tige de la base	0,28 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,18 ± 0,06
Tyrosine	Tige du sommet	0,43 ± 0,24	0,08 ± 0,03	0,19 ± 0,15
	Tige de la base	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,12 ± 0,06
Méthionine	Tige du sommet	0,11 ± 0,04	0,06 ± 0,00	0,09 ± 0,01
	Tige de la base	0,07 ± 0,03	0,07 ± 0,02	0,23 ± 0,18
Valine	Tige du sommet	5,38 ± 3,20	5,03 ± 1,13	4,75 ± 0,55
	Tige de la base	4,03 ± 2,40	4,42 ± 0,38	4,74 ± 1,38
Isoleucine	Tige du sommet	0,30 ± 0,02	0,12 ± 0,06	0,07 ± 0,03
	Tige de la base	0,22 ± 0,03	0,16 ± 0,07	0,10 ± 0,02
Leucine	Tige du sommet	0,22 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,08 ± 0,02
	Tige de la base	0,19 ± 0,01	0,16 ± 0,05	0,08 ± 0,02
Phénylalanine	Tige du sommet	0,16 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,11 ± 0,03
	Tige de la base	0,09 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,14 ± 0,08
Tryptophane	Tige du sommet	0,41 ± 0,23	1,81 ± 1,54	0,74 ± 0,77
	Tige de la base	0,25 ± 0,17	1,19 ± 0,80	0,49 ± 0,26

Annexe XIV : résultats des dosages des acides aminés au sommet et à la base de la tige en réponse au traitement N2N0N2.

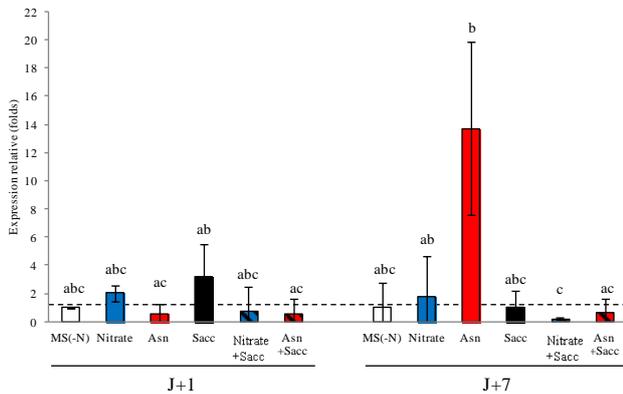
		N2N0N2					
		J+0		J+7		J+14	
Hydroxyproline	Tige du sommet	0,07	± 0,09	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
	Tige de la base	0,00	± 0,00	0,06	± 0,06	0,02	± 0,02
Histidine	Tige du sommet	0,10	± 0,04	0,14	± 0,05	0,14	± 0,04
	Tige de la base	0,11	± 0,07	0,23	± 0,07	0,15	± 0,08
Sérine	Tige du sommet	1,09	± 0,49	2,80	± 1,26	2,56	± 0,70
	Tige de la base	0,72	± 0,21	2,90	± 0,58	1,71	± 0,37
Arginine	Tige du sommet	0,38	± 0,10	1,48	± 1,17	2,46	± 2,07
	Tige de la base	1,13	± 1,15	2,09	± 1,44	5,41	± 3,47
Glycine	Tige du sommet	0,18	± 0,07	0,30	± 0,14	0,16	± 0,04
	Tige de la base	0,16	± 0,05	0,36	± 0,11	0,08	± 0,03
Glutamate	Tige du sommet	4,01	± 2,16	9,42	± 3,07	8,50	± 1,98
	Tige de la base	3,72	± 0,46	9,74	± 1,16	6,47	± 1,69
Alanine	Tige du sommet	0,92	± 0,41	2,81	± 0,63	1,88	± 0,25
	Tige de la base	0,81	± 0,18	3,31	± 0,58	1,61	± 0,34
Thréonine	Tige du sommet	0,51	± 0,23	0,74	± 0,27	0,88	± 0,24
	Tige de la base	0,37	± 0,06	0,71	± 0,03	0,94	± 0,28
GABA	Tige du sommet	0,28	± 0,11	1,49	± 0,66	1,08	± 0,80
	Tige de la base	0,43	± 0,37	1,80	± 1,27	1,06	± 0,80
Proline	Tige du sommet	0,26	± 0,06	2,75	± 1,72	3,05	± 1,60
	Tige de la base	0,30	± 0,11	6,37	± 1,31	5,04	± 2,09
Méthylcystéine	Tige du sommet	0,07	± 0,03	0,05	± 0,01	0,09	± 0,03
	Tige de la base	0,10	± 0,02	0,11	± 0,06	0,07	± 0,02
Ornithine	Tige du sommet	0,07	± 0,01	0,11	± 0,04	0,26	± 0,12
	Tige de la base	0,18	± 0,06	0,14	± 0,05	0,21	± 0,01
Cystine	Tige du sommet	0,10	± 0,05	0,08	± 0,02	0,56	± 0,53
	Tige de la base	0,15	± 0,12	0,23	± 0,11	0,20	± 0,03
Lysine	Tige du sommet	0,65	± 0,48	0,23	± 0,05	0,34	± 0,11
	Tige de la base	0,39	± 0,05	0,54	± 0,32	0,28	± 0,07
Tyrosine	Tige du sommet	0,08	± 0,06	0,24	± 0,13	0,24	± 0,04
	Tige de la base	0,34	± 0,20	0,22	± 0,12	0,18	± 0,03
Méthionine	Tige du sommet	0,12	± 0,04	0,29	± 0,11	0,06	± 0,02
	Tige de la base	0,43	± 0,38	0,08	± 0,03	0,05	± 0,01
Valine	Tige du sommet	8,80	± 4,67	6,96	± 2,32	7,09	± 2,45
	Tige de la base	6,21	± 1,58	9,22	± 2,78	4,46	± 1,39
Isoleucine	Tige du sommet	0,32	± 0,12	0,22	± 0,11	0,31	± 0,12
	Tige de la base	0,24	± 0,02	0,22	± 0,09	0,33	± 0,18
Leucine	Tige du sommet	0,16	± 0,04	0,19	± 0,07	0,26	± 0,09
	Tige de la base	0,22	± 0,02	0,25	± 0,11	0,25	± 0,06
Phénylalanine	Tige du sommet	0,11	± 0,07	0,12	± 0,03	0,17	± 0,07
	Tige de la base	0,13	± 0,03	0,19	± 0,06	0,15	± 0,03
Tryptophane	Tige du sommet	0,45	± 0,41	0,07	± 0,03	0,20	± 0,11
	Tige de la base	0,44	± 0,20	0,14	± 0,05	0,31	± 0,13



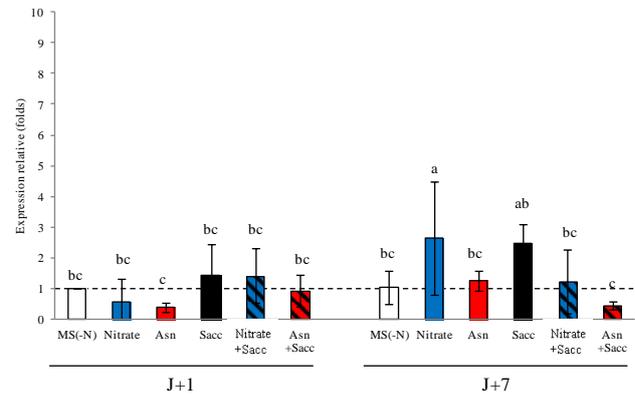
# ANNEXES des résultats de q-PCR

Annexe XV : résultats de q-PCR pour les gènes impliqués dans le métabolisme des régulateurs de croissance impliqués dans le débourrement (*YUC1*, *PINI*, *MAX2*, *IPT3*, *ARR5*) à J+1 et J+7 dans la tige (a, c, e, g, i) et dans le bourgeon (b, d, f, h, j) respectivement. Les niveaux d'accumulation des transcrits sont exprimés en folds ( $\pm$ se, n=3 de 3 répétitions techniques chacune) par rapport à la référence (milieu de base MS(-N) à J+1) et les analyses statistiques ont été réalisées sur les log du nombre de copies.

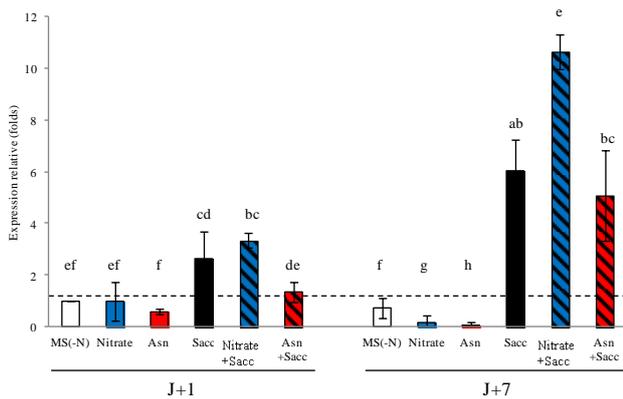
(a) *YUC1* – tige



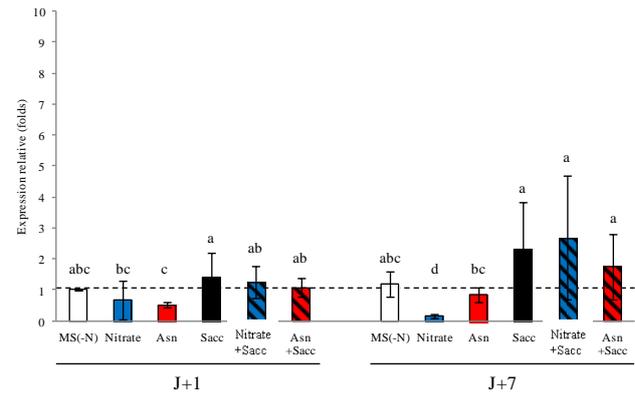
(b) *YUC1* – bourgeon



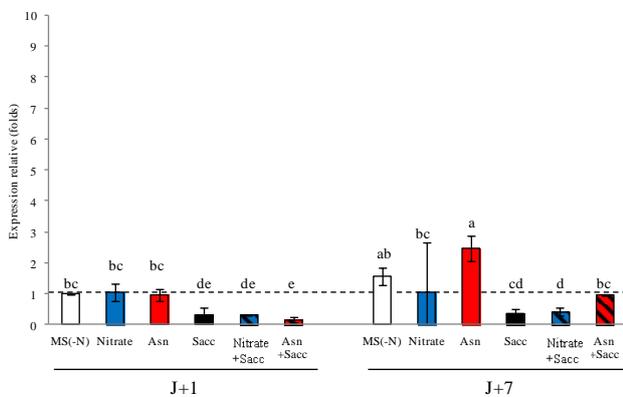
(c) *PINI* – tige



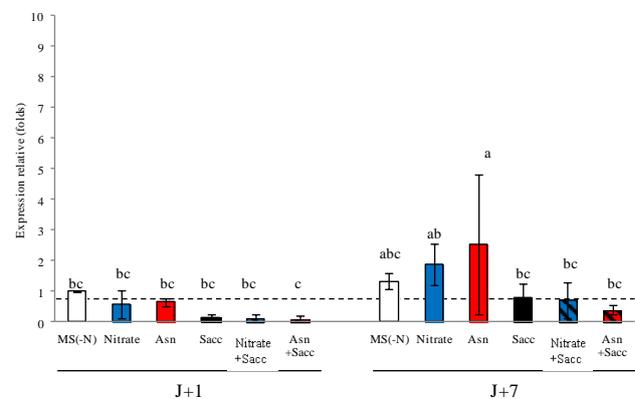
(d) *PINI* – bourgeon



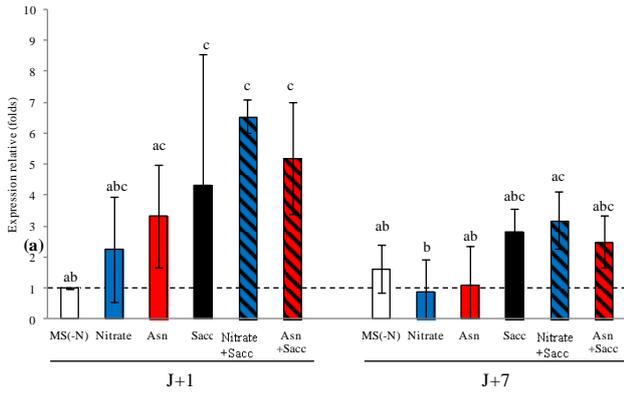
(e) *MAX2* – tige



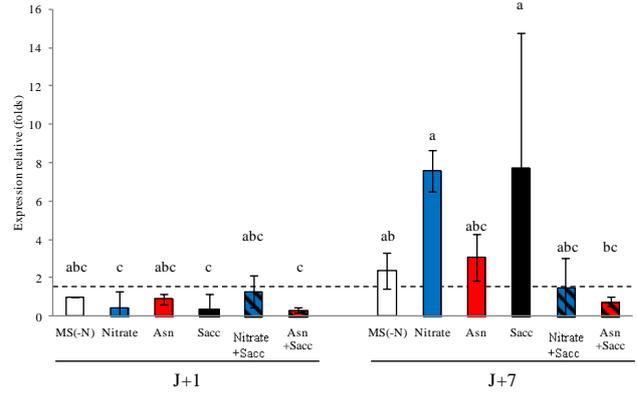
(f) *MAX2* – bourgeon



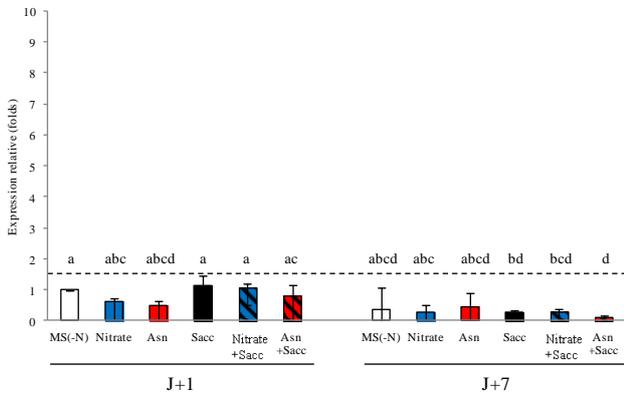
(g) *IPT3* – tige



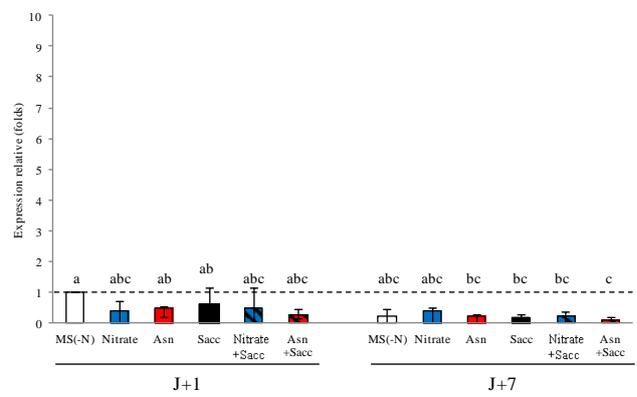
(h) *IPT3* – bourgeon



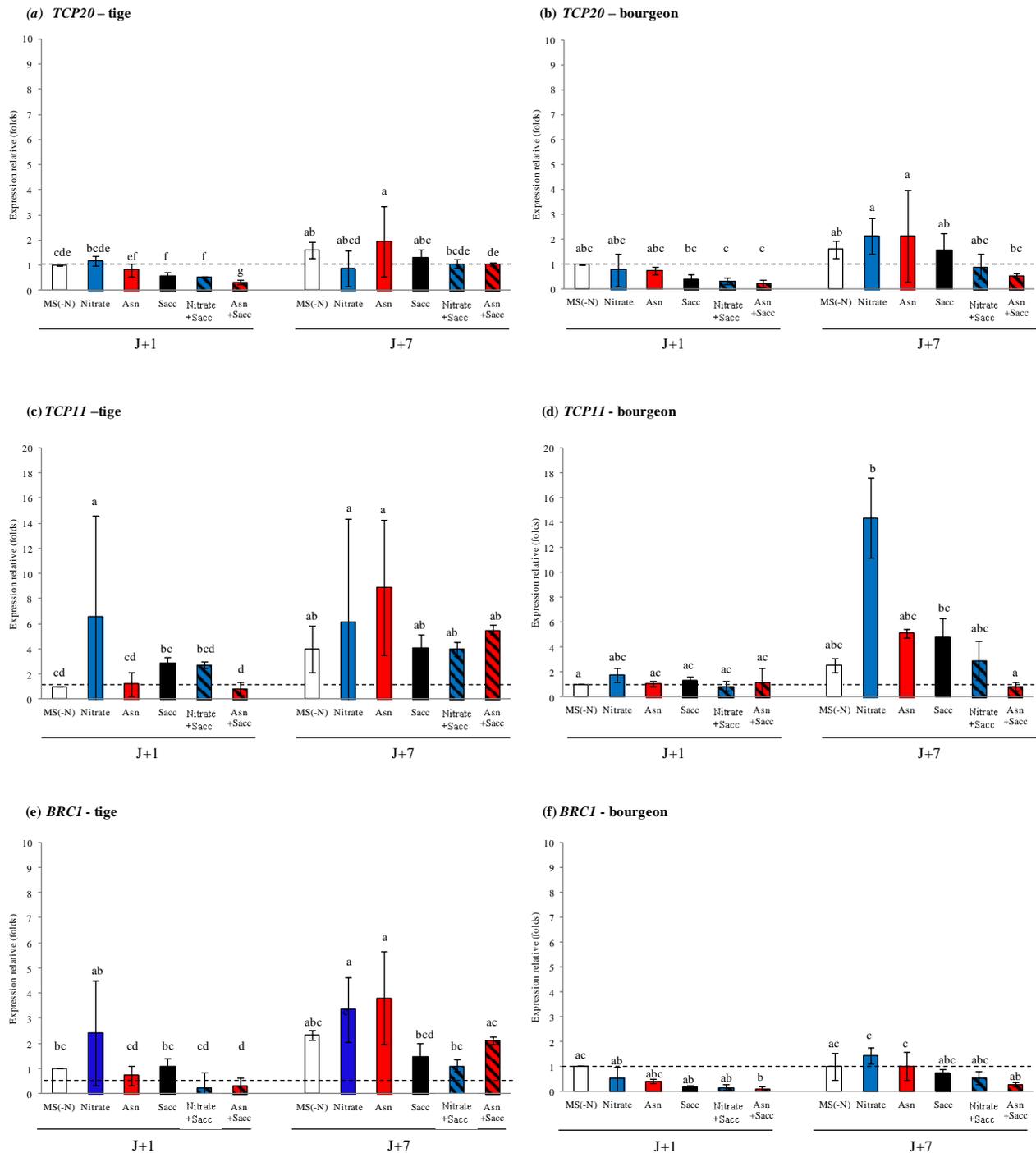
(i) *ARR5* – tige



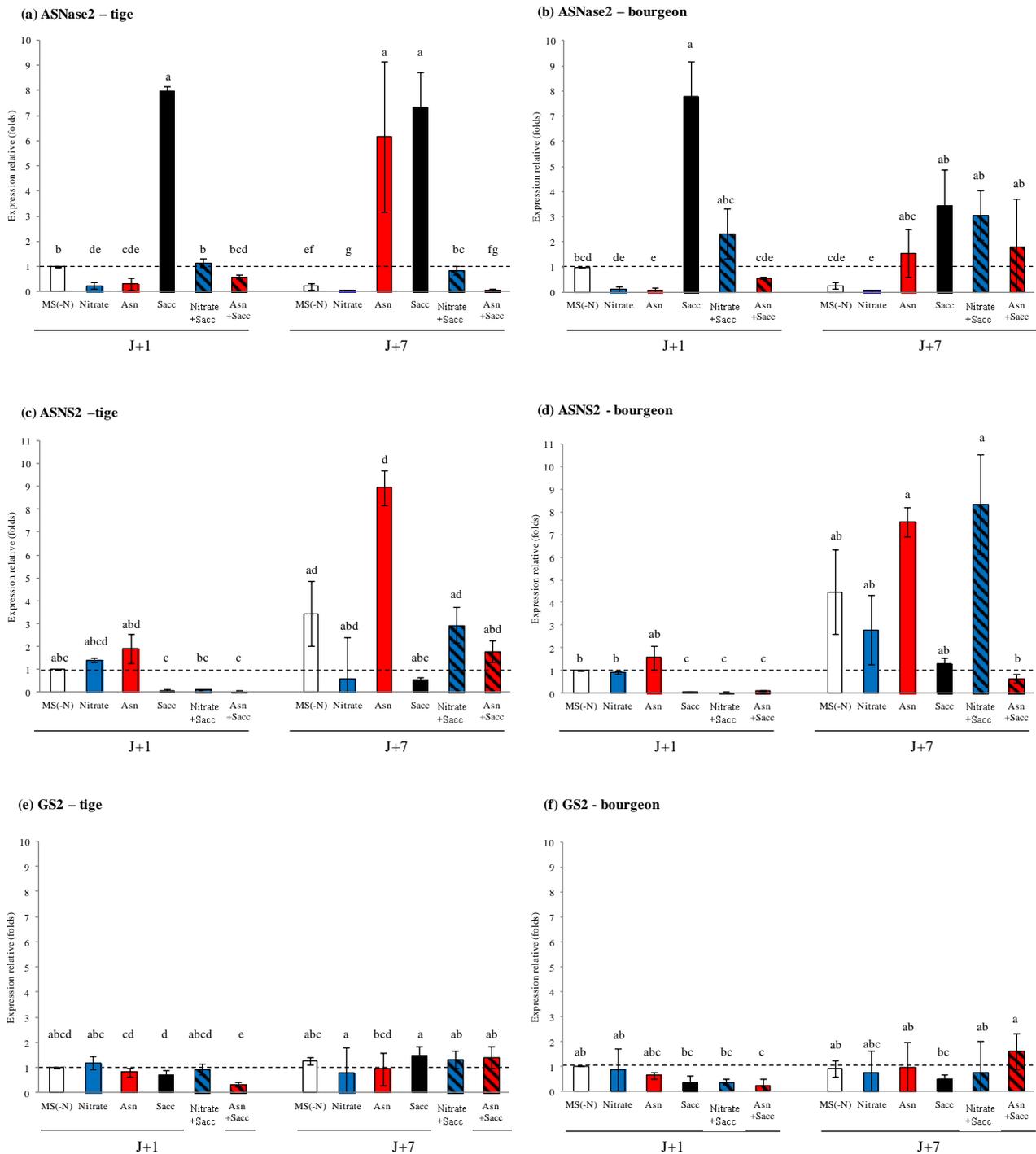
(j) *ARR5* – bourgeon



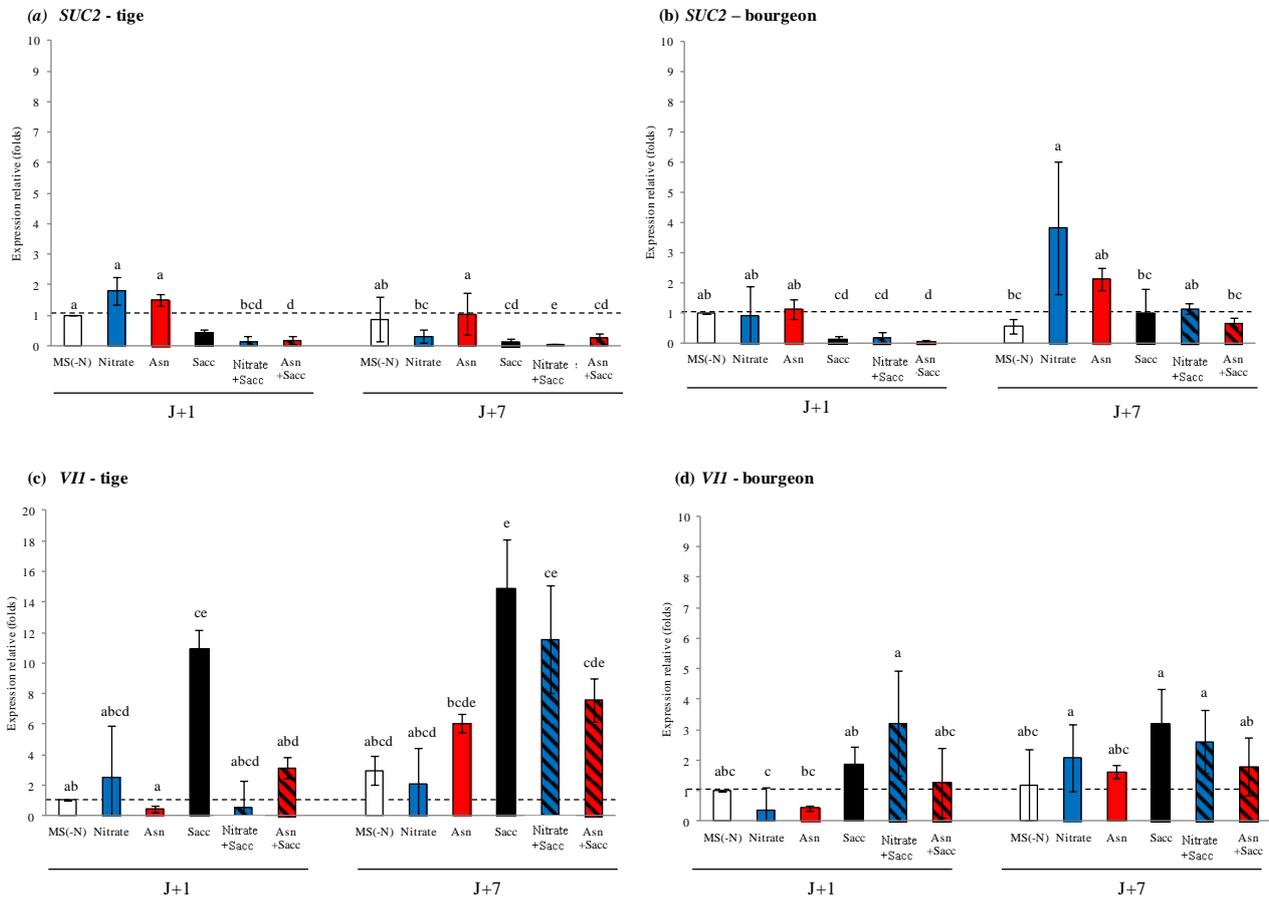
Annexe XVI : résultats de q-PCR pour les gènes codant les facteurs de transcription (*TCP20*, *TCP11* et *BRC1*) à J+1 et J+7 dans la tige (a, c, e) et dans le bourgeon (b, d, f) respectivement. Les niveaux d'accumulation des transcrits sont exprimés en folds ( $\pm$ se, n=3 de 3 répétitions techniques chacune) par rapport à la référence (milieu de base MS (-N) à J+1) et les analyses statistiques ont été réalisées sur les log du nombre de copies.



Annexe XVII : résultats de q-PCR pour les gènes impliqués dans le métabolisme de l'asparagine (*ASNase2*, *ASNS2* et *GS2*) à J+1 et J+7 dans la tige (a, c, e) et dans le bourgeon (b, d, f) respectivement. Les niveaux d'accumulation des transcrits sont exprimés en folds ( $\pm$ se, n=3 de 3 répétitions techniques chacune) par rapport à la référence (milieu de base MS (-N) à J+1) et les analyses statistiques ont été réalisées sur les log du nombre de copies.



Annexe XVIII : résultats de q-PCR pour les gènes impliqués dans le métabolisme des sucres (*SUC2* et *VII*) à J+1 et J+7 dans la tige (a, c) et dans le bourgeon (b, d) respectivement. Les niveaux d'accumulation des transcrits sont exprimés en folds ( $\pm$ se, n=3 de 3 répétitions techniques chacune) par rapport à la référence (milieu de base MS (-N) à J+1) et les analyses statistiques ont été réalisées sur les log du nombre de copies.







# VALORISATIONS SCIENTIFIQUES

- Article accepté :

**Le Moigne, M.-A., Guérin, V., Furet, P.-M., Billard, V., Lebrec, A., Spichal, L., Roman, H., Citerne, S., Morvan-Bertrand, A., Limami, A., Vian, A., Lothier, J., 2018.** Asparagine and sugars are both required to sustain secondary axis elongation after bud outgrowth in *Rosa hybrida*. *J. Plant Physiol.* 18.

- Articles en cours de rédaction :

**Le Moigne *et al.*** : effets de l'asparagine sur le niveau d'expression des gènes impliqués dans le débourrement chez *Rosa hybrida* (titre provisoire).

**Le Moigne *et al.*** : adaptation du métabolisme de l'asparagine et des sucres en réponse à différents niveaux de nutrition azotée au cours du débourrement chez *Rosa hybrida* (titre provisoire).

- Communications internationales (deux posters différents affichés) :

**Le Moigne, M.-A., Guérin, V., Furet, P.-M., Vian, A., Lothier, J., 2017.** Asparagine is the major amino acid involved in nitrogen supply of the new axis resulting from the bud outgrowth in *Rosa hybrida*. Colloque international. VII International Symposium on Rose Research and Cultivation. Angers.

**Le Moigne, M.-A., Guérin, V., Furet, P.-M., Vian, A., Lothier, J., 2016.** Asparagine is the major amino acid involved in nitrogen supply of the new axis resulting from the bud outgrowth in *Rosa hybrida*. Colloque international. Société Française de Biologie Végétale. Angers.



**Asparagine and sugars are both required to sustain secondary axis elongation after bud outgrowth in *Rosa hybrida***

Marie-Anne Le Moigne<sup>1</sup>, Vincent Guérin<sup>1</sup>, Pierre-Maxime Furet<sup>1</sup>, Vincent Billard<sup>1</sup>, Anita Lebrec<sup>1</sup>, Lukáš Spíchal<sup>2</sup>, Hanaé Roman<sup>1</sup>, Sylvie Citerne<sup>3</sup>, Annette Morvan-Bertrand<sup>4</sup>, Anis Limami<sup>1</sup>, Alain Vian<sup>1\*</sup>, Jérémy Lothier<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> IRHS, Agrocampus-Ouest, INRA, Université d'Angers, SFR 4207 QuaSaV, 42 rue Georges Morel, 49071, Beaucouzé, France

<sup>2</sup> Department of Chemical Biology and Genetics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, CZ-78371 Olomouc, Czech Republic

<sup>3</sup> Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay, 78000 Versailles, France, LabEx Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-10-LABX-0040-SPS).

<sup>4</sup> Normandie Univ, UNICAEN, INRA, EVA, 14000 Caen, France.

\* These authors contributed equally to this work.

**Author for correspondence:**

*Jérémy Lothier*

*Tel: +33 (0)2 41 22.56.42*

*Email: jeremy.lothier@univ-angers.fr*



## Summary

Nitrogen is required for optimal plant growth, especially in young organs such as secondary axes (axes II) after axillary bud outgrowth. Several studies have shown an increase of nitrogen concentration in xylem sap concomitantly with bud outgrowth, but the relation between nitrogen, sugars and plant hormones in axis II still remains unclear. We investigated in *Rosa hybrida* the involvement of nitrogen nutrition in axis II elongation in relation with sugars and cytokinins using <sup>15</sup>N-labeled nitrate and sugars, amino acids and cytokinin quantifications. Besides, we measured the effect of the exogenous supply of these compounds on axis II elongation using *in vitro* excised bud culture. We demonstrated that nitrogen in the axis II comes mainly from new root uptake after decapitation. Asparagine, which concentration increases in sap exudates and tissues during axis II elongation, was the sole amino acid able to sustain an efficient elongation *in vitro* when supplied in combination with sucrose.

**Keys words:** amino acids, asparagine, axis elongation, bud outgrowth, nitrogen, sucrose.

## Introduction

The production of new axes is the key process of plant growth and development that leads to the establishment of a plant shape corresponding to a given architecture. These new axes result from axillary bud outgrowth, a mechanism dependent on internal factors such as genetic background (Li-Marchetti et al., 2015) and plant metabolism such as plant hormones (Domagalska and Leyser, 2011), sugar signalling (Barbier et al., 2015; Mason et al., 2014) and sugar nutrition (Bonhomme et al., 2010; Girault et al., 2010). These traits are also regulated by external factors such as light quantity and quality (Leduc et al., 2014), temperature (Djennane et al., 2014), water (Demotes-Mainard et al., 2013) and nitrogen availability (Huché-Thélier et al., 2011; Furet et al., 2014).

Auxin, strigolactones and cytokinins are the main plant hormones involved in the regulation of bud outgrowth, forming a systemic network that allows integration of information between different plant organs during this process (Ferguson and Beveridge, 2009). Auxin is synthesized in the apex and transported basipetally in the polar transport stream to impose the apical dominance, according to the “auxin transport canalization model” or the “second messenger model” (Domagalska and Leyser, 2011). In the latter model, auxin inhibits cytokinin production (Tanaka et al., 2006) and stimulates expression of strigolactones biosynthesis and signalling (Brewer et al., 2009; Hayward et al., 2009), promoting axillary bud dormancy. Cytokinins are known to promote cell growth and differentiation, and their synthesis through the *IPT3* gene is stimulated by light (Roman et al., 2016), sugars (Barbier et al., 2015) and nitrogen (Xu et al., 2015). Cytokinins are produced in the roots in response to nitrate supply (Takei et al., 2001). Beside, Lu et al. (2009) have shown in tomato that nitrate, rather than ammonium, enhances cytokinin content in xylem sap exported from the roots concomitantly with shoot development. Recent studies have demonstrated that cytokinins involved in bud outgrowth initiation are synthesized in the stem in the vicinity of the buds, rather than in the roots (Liu et al., 2011; Tanaka et al., 2006). Cytokinin content is also correlated to invertase gene expression and enzyme activity in the vicinity of the outgrowing buds, promoting nutrient sink strength (Liao et al., 2013; Rabot et al., 2012; Roitsch and Ehneß, 2000).

It has been clearly demonstrated in both herbaceous and ligneous plants that a high level of nitrogen fertilization (nitrate and/or ammonium) increases the number of axes II (Furet et al., 2014; Li et al., 2016; Lortie and Aarssen, 1997) and promotes the efficient elongation of these new shoots (Médiène et al., 2002; Cline et al., 2006). Tagliavini et al. (1999) and Thitithanakul et al. (2012) have also shown that the period of nitrogen uptake throughout the year affects axis II elongation in nectarine trees and poplar, respectively. Nitrogen translocated in the new axis as nutrient supply may have a dual origin in plants. It can firstly originate from root uptake. After nitrate uptake, nitrate reduction to ammonium and later incorporation into amino acids generally occurs in roots in ligneous plants, while it is located in the shoot of herbaceous plants (Gojon et al., 1994). Thus, mainly amino

acids and only traces of nitrate or ammonium are transported in the xylem to the shoots in spruce (Dambrine et al., 1995), and used as substrates for the synthesis of proteins and other organic nitrogen-containing compounds to sustain growth. Secondly, nitrogen could arise from molecules present in the plant before decapitation (Millard, 1996), as bud outgrowth may occur in spring flush in trees when nitrogen uptake is low and photosynthesis unable to provide precursors for amino acid synthesis (Dong et al., 2001; Tromp and Ovaas, 1976). The same process took place after shoot removal by cutting in alfalfa (Avicé et al., 1996; Ourry et al., 1988). The relative involvement of the new root uptake *versus* storage mobilization in the nitrogen supply of the actively growing new axis also vary according to the tree species, the age, the climate of the previous year (Dong et al., 2001; Harrison et al., 2000). For example, in 50-year-old oak trees, nitrogen of new axes accounts for 18% from uptake, while in birch trees it reaches 63% (El Zein et al., 2011; Millard et al., 1998). Nitrogen is translocated in sap, where several studies have measured a 10-fold increase in the xylem during bud outgrowth (Millard et al., 1998), mainly (95%) in the form of amino acids (Guak et al., 2003). The most abundant are asparagine, arginine, aspartate and glutamine in apple, cherry and poplar trees (Grassi et al., 2002; Guak et al., 2003; Malaguti et al., 2001), while citrulline and glutamine are the predominant forms in birch and walnut trees. Long-distance transport of amino-acids also occurs in the phloem, generally in a basipetal direction to reallocate previously stored nitrogen to sustain new axis growth (Tromp and Ovaas, 1971) and/or to regulate nitrate uptake and transport from roots to shoot (Geßler et al., 2004; Muller and Touraine, 1992). The main amino acids in phloem sap are asparagine and glutamine in rice (Hayashi and Chino, 1990), while asparagine and arginine are predominant in apple trees (Tromp and Ovaas, 1971).

Several studies have pointed out the interactions between nitrogen and carbon metabolism during bud outgrowth. Nitrogen availability and light intensity regulate synergistically the number of outgrowing buds (Furet et al., 2014; Keller and Koblet, 1995). Nitrate deficiency strongly reduced the inductive effect of light, in accordance with lower sucrose contents in rose leaves and stems (Furet et al., 2014). Guérin et al. (2007) showed in privet (*Ligustrum ovalifolium*) that insufficient nitrogen supply limits the use of carbon in roots, more of which being directed to aerial organs through the sap flow. Nitrate deficiency also significantly reduces photosynthetic rate, leaf area and leaf chlorophyll concentration, and consequently leads to a lower biomass production (Gulmon and Chu, 1981; Zhao et al., 2005). High invertase gene expression and enzyme activity during bud outgrowth are well documented (Liao et al., 2013; Rabot et al., 2012), suggesting that sucrose is used for carbon supply of elongating axes II. Furthermore, Dhont et al. (2012) have demonstrated that sucrose, glutamine and arginine contents increase concomitantly in apical outgrowing buds in spruce. Similarly to nitrogen, carbon translocated in the new axis as nutrient supply may have two origins. Firstly, it can originate from current photosynthesis after bud outgrowth initiation: Kebrom and Mullet (2015) have shown in sorghum that variations in leaf area and photosynthetic activity regulate axis II elongation, and a close

correlation between axis II elongation and the influx of sucrose in the xylem sap was also found in walnut (Bonhomme et al., 2010). Secondly, carbon can be fixed before the initiation of bud outgrowth and later mobilized for incorporation in axes II.

While the contribution of interactions between hormones and sugar is well describe in the control of bud outgrowth, the nutrient counterpart of actively elongating axis II is nowadays poorly documented. In this work, we have analyzed the amino acids in the sap and in the different organs during the bud outgrowth and the axis II elongation in 7-week-old decapitated rose plants, under non-limiting nitrate supply. We also studied *in vitro* the involvement of amino acids found in the sap and the tissues in the axis II elongating efficiency, in combination with sugars. Finally, we linked the cytokinin status in different nutritional contexts to axis II elongating efficiency. Our results highlighted the absolute requirement of the simultaneous presence of asparagine and sucrose to sustain axis II elongation.

## **Materials and methods**

### **Plant material and growth conditions**

All experiments were carried out using plants from clones of a single genotype of *Rosa hybrida* 'Radrazz'. Plants were grown in a glasshouse for 5 weeks after cutting (Fig. 1A) in 0.5 liter pots containing substrate (Irish peat, perlite, coconut fiber; 50/40/10; v/v/v) and covered with flint gravel. Plants were taken from the glasshouse a week after potting and placed in a control growth chamber under non-limiting white light (16h/8h-day/night, 22°C, 300-400  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Soaking was done manually every two days by sub-irrigation with a nutrient solution containing 12 mM nitrate (0.75 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1.5 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 0.6 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10  $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  of a commercial solution at 49  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , trace elements 1 mL/10L from Kanieltra® solution)

### **Tissues and sap exudates sampling and $^{15}\text{N}$ labelling**

Axis I (Fig. 1B) was decapitated (D0) when the flower bud was just protruding out of the young leaves (flower bud visible stage), to remove apical dominance in order to initiate axis II elongation (Fig. 1B) resulting from axillary bud outgrowth, measured at D7 using a numeric calliper. The substrate was rinsed with deionised water at D0 and nitrate in the nutrient solution (12 mM) was replaced by 10 %  $^{15}\text{N}$ -labeled nitrate ( $\text{K}^{15}\text{NO}_3$ , 12 mM), until the harvest of the different organs at D7. Harvests of roots, stem, leaves and axis II tissues were performed at the decapitation day (D0) and one or two weeks after D0 (D7 or D14, respectively). The tissues of three plants per biological repetition ( $n=3$ ) were crushed in liquid nitrogen and the resulting powder was lyophilised (LyoVac, SRK, GE). Sap exudates were harvested at D0 and D7 with pipette tips by cutting the stem just above the substrate under the more basal bud (Fig 1B, corresponding mainly to xylem sap) and frozen in liquid nitrogen. Stem fragments carrying axillary buds in positions 2 and 3 along axis I (0.1 cm on each side

of the axillary bud) were excised for *in vitro* cultivation from complete plants at the “five leaves developed” stage, and harvests took place at D1 for transcriptomic analysis.

#### **Measurements of the Nitrate reductase activity (NRA).**

NRA was measured following a protocol modified from Foyer et al. (1994). 200 mg of fresh material were ground in 1 mL extraction buffer (HEPES 50 mM, pH 7.8, EDTA 5 mM, cysteine 10 mM). The extract was then centrifuged at 12 000g for 5 min at 4°C, then 50mg of PVP40 was added to 1 mL of supernatant and centrifuged at 12 000g for 15 min at 4°C. One volume of reaction buffer (HEPES 50 mM, pH 7.8, EDTA 5 mM, cysteine 10 mM, KNO<sub>3</sub> 10 mM, NADH 0,20 mM) was added to 1 volume of extract and incubated at 30°C for 30 min. Colorimetric reaction was performed by the addition of 2 volumes of sulfanilamide 1% (w/v) in 3N HCl to two volumes of N-naphtyl-1-ethylene diamine dichlorohydrate 0.02% (w/v). The OD was measured at 450 nm on a EL808 spectrophotometer (BioTek Instruments Inc, Winoosky, USA). A blank was performed following the same protocol but without the incubation step. Thereafter, NRA was calculated as NO<sub>2</sub> produced per hour per mg protein and per g of fresh weight.

#### **Measurements of amino acids in tissues and sap exudates**

Amino acids in tissues of three plants per biological repetition (20 mg DW, n=3) were extracted through a phase partition procedure using methanol/chloroform/water (2:1:2). DL-3-aminobutyric acid (BABA) was used as an internal standard (100 µM in methanol). The polar phase was withdrawn for analysis through an Acquity UPLC BEH C18 column (2.1 mm\*100 mm, 1.7 µm particles) heated at 55°C, according to Gaudin et al., (2014). Amino acid concentrations in the sap exudates were determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Extraction of 10 µL or 50 µL and purification of amino acids on cation-exchange column (DOWEX 50W-X8) and their quantification with a 436-GC coupled to a simple quadruple SCION MS (Bruker), were carried out according to Bobille et al. (2016).

#### **Measurements of sugars and nitrate in tissues**

Sucrose, glucose, and fructose concentrations in tissues of three plants per biological repetition (20 mg DW per sample, n=3) were ground in a mortar in the presence of 1 mL 80% methanol. Sugars were extracted and analyzed by HPLC on a CarboPac PA-1 column (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA), according to Leprince et al. (2004). The nitrate content was measured according to Cataldo et al. (1975).

### ***In vitro* culture in solid medium**

Stem fragments carrying axillary buds were grown *in vitro* on a solid basic medium containing agar (8 g/L), lacking nitrogen and sugars, but supplemented with macroelements, microelements and vitamins. The medium was then supplemented with 100 mM sugars (sucrose, fructose or glucose) and/or nitrate, ammonium or individual amino acids (1 mM to 30 mM). Mannitol (100 mM) was used as a non-metabolisable osmotic control. We also tested the effect of 1  $\mu$ M and 10  $\mu$ M of a synthetic form of cytokinins (6-Benzylaminopurine, BAP, in 6 % v/v DMSO) and of 10  $\mu$ M of LGR-991, an inhibitor of cytokinin perception acting as a competitor of the cytokinin receptors Arabidopsis Histidine kinase (AHK4 and AHK3; Spíchal et al., 2009). A previous study in rose has shown that this inhibitor can be used up to 1 mM in 1 % DMSO (v/v) *in planta* with no toxic effect (Roman *et al.*, 2016). In this *in vitro* context, we used it at a concentration of 10  $\mu$ M in DMSO. About 15 nodes were cultivated in the same Petri dishes, that constitute one of the three technical repetitions for each biological repetition (n=3). The Petri dishes were placed in a controlled growth chamber with a 16h photoperiod at a temperature of 22°C during 7 days (D7). In this experiment, *in vitro* excised buds were no longer subjected to apical dominance or competition between organs that takes place in intact plants: they should be able to outgrow if the nutrient molecules in the medium were adapted. Elongation of the axis II resulting from bud outgrowth was measured at D7 using a numeric calliper.

### **Measurements of plant cytokinins**

For each stem sample cultivated *in vitro* (n=3), 10 mg of dry powder were extracted with 0.8 mL of acetone/water/acetic acid (80/19/1, v/v/v). Cytokinins stable labelled isotopes used as internal standards were prepared as described in Le Roux et al. (2014). Then, 2 ng of each and 0.5 ng cytokinines standard was added to the sample. The extract was vigorously shaken for 1min, sonicated for 1 min at 25 Hz, shaken for 10 minutes at 10°C in a Thermomixer Eppendorf<sup>®</sup>, and then centrifuged (8,000g, 10 °C, 10 min.). The supernatants were collected, and the pellets were re-extracted twice with 0.4 mL of the same extraction solution, then vigorously shaken (1 min) and sonicated (1 min; 25 Hz). After the centrifugations, the three supernatants were pooled and dried (Final Volume 1.6 mL). Each dry extract was dissolved in 100  $\mu$ L of acetonitrile/water (50/50, v/v), filtered, and analyzed using a Waters Acquity ultra performance liquid chromatograph coupled to a Waters Xevo Triple quadrupole mass spectrometer TQS (UPLC-ESI-MS/MS). The compounds were separated on a reverse-phase column (Uptisphere C18 UP3HDO, 100\*2.1 mm\*3 $\mu$ m particle size; Interchim, France) using a flow rate of 0.4 mL min<sup>-1</sup> and a binary gradient: (A) acetic acid 0.1 % in water (v/v) and (B) acetonitrile with 0.1 % acetic acid, the column temperature was 40 °C, for indole-3-acetic acid we used the following binary gradient (time, % A): (0 min., 98 %), (3 min., 70 %), (7.5 min., 50 %), (8.5 min., 5 %), (9.6 min., 0%), (13.2 min., 98 %), (15.7 min., 98 %), and for cytokinines (time, % A): (0 min., 95 %), (13 min., 40 %), (16 min., 0 %), (16.5 min., 95 %). Mass spectrometry was conducted in

electrospray and Multiple Reaction Monitoring scanning mode (MRM mode), in negative ion mode. Relevant instrumental parameters were set as follows: capillary 1.5 kV (negative mode), source block and desolvation gas temperatures 130°C and 500°C, respectively. Nitrogen was used to assist the cone and desolvation (150 L h<sup>-1</sup> and 800 L h<sup>-1</sup>, respectively), argon was used as the collision gas at a flow of 0.18 mL min<sup>-1</sup>.

### **RNA Extraction, Reverse Transcription, and qRT-PCR**

RNA was extracted from frozen stem tissues cultivated *in vitro* (from 50 to 100 mg FW) using a lysing buffer (80°C) composed of guanidine isothiocyanate (4 M), EDTA (25 mM), PVP40 (2.5 %), sarcosyl (2 %) and sodium acetate (0.2 M), pH 5.5 (MacKenzie *et al.*, 1997; Gambino & Gribaudo, 2006). Samples were heated at 70°C for 10 min before chloroform / isoamyl alcohol (24/1; v/v) step. The aqueous phase was recovered and transferred in violet column of RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) following the supplier's protocol. A DNase treatment (Qiagen) was performed. RNA was quantified using NanoDrop technology and quality was verified on gel electrophoresis. cDNAs were obtained by reverse transcription performed on 1 µg of RNA using SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed with SYBR Green according to previous studies using primers of the *adenosine phosphate-isopentenyltransferase 3* gene (*RhIPT3*), which encodes a key enzyme in cytokinin biosynthesis in *Rosa hybrida* (Barbier *et al.*, 2015; Roman *et al.*, 2016). Enzymatic mix and cDNA samples were distributed using a Calliper Life Sciences robot. Three technical repetitions for each of the three biological samples were made, gene by gene on plates of 384 wells. Relative gene expression was expressed in folds calculated using the method and the statistical analysis developed in Pfaffl, 2001 and Berruyer *et al.*, 2006. Data were normalized by using *RhEF1α* housekeeping gene (Elongation Factor, Girault *et al.* (2010). PCR efficiency was determined by a range of five points (Bio-Rad CFX Manager software). Negative controls were done by replacing cDNA with sterile water.

### **Nitrogen isotope and elemental analysis**

Freeze-dried axis II samples were ground to obtain a homogeneous fine powder at the end of labeling period (D7). A subsample of about 2 mg was used to determine total nitrogen content and <sup>15</sup>N abundance (A%) using an elemental analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy) coupled to an isotope ratio mass spectrometer (Isoprime, GV Instrument, Manchester, UK) calibrated for measuring <sup>15</sup>N natural abundance. The <sup>15</sup>N abundance ( $A\% = \frac{^{15}\text{N}}{^{15}\text{N} + ^{14}\text{N}} \times 100$ ) was used to calculate the relative contribution of nitrogen originated from nitrate, uptaken before *versus* after decapitation in the axis II. For each new axis, the percentage of nitrogen coming from nitrate uptaken after decapitation (post-decapitation N) was calculated according to the method developed by Visser *et al.* (1997) :

$$\text{Post-decapitation N}(\%) = \frac{(A\%_{\text{sample}} - A\%_{\text{controlplant}})}{(A\%_{\text{source}} - A\%_{\text{controlplant}})} \times 100$$

A%sample represents the <sup>15</sup>N abundance percentage in the organ considered (new axis), A% source corresponds to the <sup>15</sup>N abundance of the labeled fertilizer and A%control plant represents the natural <sup>15</sup>N abundance percentage of the same organ. A%control plant was close to 0.36634, a value which corresponds to the natural abundance of atmospheric dinitrogen (N<sub>2</sub>). For a given organ, the “post-decapitation N” can be roughly defined as the ratio of nitrogen originating from the labelled fertilizer supplied after decapitation to the total nitrogen content.

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using RStudio (version 0.99.879) on at least three biological replications. Student-Newman-Keuls (SNK; P < 0.05) method is a stepwise multiple comparison procedure used to identify sample means that are significantly different from each other.

## Results

### Dry weight production and origin of axis II nitrogen

Buds along the axis I were able to grow out, producing new axes II when rose cuttings were irrigated with a solution containing a high (12 mM) level of nitrate (Fig. 2A). Length, biomass and nitrogen content were maximum in Axis II-4, originating from the most apical bud on axis I (elongation of 3.7 cm, Fig. 2A; dry weight of 13.8 mg, Fig. 2B; nitrogen content of 0.6 mg, Fig. 2C). They were minimum in the axis II originating from the more basal bud (Axis II-1) where the measured values were respectively 0.8 cm, 6.6 mg and 0.2 mg (Fig. 2A-C). To decipher the origin of nitrogen in the growing axis II, plants were supplied with <sup>15</sup>N nitrogen after decapitation. The contribution of nitrogen originated from nitrate new root uptake after decapitation (post-decapitation N; Fig. 2D) was similar in the four new axes II, regardless of their position along the axis I. Nitrogen mainly originated from new root uptake (post-decapitation, 54 % at D4 and 85 % at D7, Fig. 2E) while only 15 % (D7) correspond to nitrogen incorporated before decapitation. Amino acids origins in axis II at D7 differ from their nature. The two nitrogen atoms of glutamine come at 100% from new root nitrate reduction and assimilation, while the other studied ones also depend in a higher part on nitrogen mobilization. New root uptake accounts for 76% in asparagine, 41% in aspartate and 50% in glutamate.

### Nitrogen containing molecules in sap exudates

We compared nitrogen metabolism in roots to the other organs. We established that NRA is low at D0 in the leaves and the stem (mean of 0.30 μg NO<sub>2</sub> produced.h<sup>-1</sup>.mg prot<sup>-1</sup>.g FW<sup>-1</sup>), and 6-fold higher in the roots (Fig 3A). In accordance, nitrate content is higher at D0 in the roots than in the stem (424 ng.mg<sup>-1</sup> DW and 39 ng.mg<sup>-1</sup> DW, respectively) (Fig 3B). We analyzed the composition of sap

exudates harvested at the base of axis I (Fig. 1B, site of sap collection). Glutamine, aspartate and asparagine were the three predominant amino acids in the sap exudates before and after decapitation (Fig 3C). Decapitation caused a 1.5-fold increase in asparagine content between D0 and D7 (5974 to 9246 pmol. $\mu\text{L}^{-1}$ ). In contrast, glutamine and aspartate concentrations remained almost constant between D0 and D7 (3036 and 4350 pmol. $\mu\text{L}^{-1}$ , respectively). The other amino acids were present at low concentrations at D0 (less than 200 pmol. $\mu\text{L}^{-1}$ , Fig. 3D) in the sap exudates. Concentrations of glutamate, serine, threonine, isoleucine, methionine, proline and GABA all significantly increased after decapitation, while the other amino acids were not affected. Nitrate and ammonium concentrations were low before decapitation (121.8 pmol. $\mu\text{L}^{-1}$  and 80.4 pmol. $\mu\text{L}^{-1}$ , respectively). Nitrate concentration strongly decreased (6.8 fold) after decapitation while ammonium concentration slightly increased (1.4-fold).

### **Amino acids and sugars contents in tissues**

We analyzed free amino acid contents in organ tissues along axis I during axes II elongation, at D0, D7 and D14 (Fig. 4A). Asparagine, glutamine and aspartate were always the predominant amino acids, and their contents were very similar before decapitation (D0) and 14 days later (D14). Surprisingly, the apex appeared to contain relatively low level of amino acids, despite the presence of actively developing leaves and flowering bud. In contrast, one week after decapitation (D7, *i.e.* at the onset of axes II elongation), we observed a strong increase in the total amino acid content, with a clear predominance of asparagine (221  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  DW) that accounts in all organs for almost two-thirds of the total amino acids (375  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  DW).

Soluble sugar contents were analyzed in the same tissues at the same time points as previously described (Fig. 4B). Decapitation caused a massive increase (3-fold) in sucrose content in leaves (38.5 to 107.6 mg. $\text{g}^{-1}$  DW from D0 to D7) which remained stable between D7 and D14. Glucose and fructose contents decreased in stem tissues after decapitation (13 mg. $\text{g}^{-1}$  DW at D0 to 6 mg. $\text{g}^{-1}$  DW at D14), while they remained more or less stable in the different organs, even in the actively elongating axis II, between D7 and D14 (15 mg. $\text{g}^{-1}$  DW).

### **Involvement of amino acids and sugars in axis II nutrition**

Involvement of sucrose and free amino acids in axis II elongation was studied through the effect of their supply (10 mM) on excised buds (Fig. 5). Median buds excised from axis I were cultivated *in vitro* and the axis II elongation was measured after a week (D7). Elongation was not observed on basic medium (Fig 5, left), even after supplementation with various sugars (100 mM).

Elongation of axis II was maximum when buds were cultivated on basic medium incorporating sugars (sucrose, glucose or fructose) supplemented with asparagine (7.5 mm and 9.0 mm at D7, respectively, Fig. 5, right). The simultaneous presence of sucrose and glutamine or GABA

resulted in a short and not statistically significant increase of axis length (3.3 mm and 4.0 mm at D7, respectively).

We tested the *in vitro* effect of predominant amino acids in sap exudates (glutamine, aspartate and asparagine, Fig. 6A) on axis II elongation in the presence of sucrose. The promotion of Axis II elongation was observed only in the presence of asparagine and was optimal (10.3 mm) for a concentration of 10 mM (Fig 6A), that corresponded to the physiological concentration measured in the sap. Aspartate and glutamine at physiological concentration (4 mM and 3 mM, respectively, Fig 6A) did not individually allow efficient elongation. We therefore tested the precursors of the two metabolic pathways of asparagine biosynthesis (glutamine-aspartate or ammonium-aspartate). In our conditions, axis II elongation was only observed in the presence of glutamine and aspartate at 10 mM each (Fig. 6B). However this elongation was only 39.5 % of that observed in the presence of 10 mM asparagine.

We studied the cytokinins (CK) status in different nutritional contexts *in vitro*, during the first steps of axis II elongation. We analyzed the active forms (CK bases and CK ribosides) contents in the median stem (bearing buds 2-3, Fig. 1B) 24 hours after bud excision (D1), in the presence or absence of sucrose combined with asparagine (Fig. 7). CK base content was maximal in the presence of sucrose ( $8.5 \text{ ng.g}^{-1} \text{ DW}$ ) and was not affected by the addition of asparagine. CK riboside contents also increased with the addition of sucrose ( $58.6 \text{ ng.g}^{-1} \text{ DW}$ ) and almost twice as much when sucrose was combined with asparagine ( $97.6 \text{ ng.g}^{-1} \text{ DW}$ ), while the addition of asparagine alone was half as effective ( $44.8 \text{ ng.g}^{-1} \text{ DW}$ ). We demonstrated that asparagine and sucrose, when supplied solely, promote *IPT3* gene expression involved in cytokinin biosynthesis (Fig. 7B). Their effect is slightly higher when the two molecules are combined. We studied the combined effects of CK, sucrose and asparagine on axis II elongation *in vitro* 7 days after decapitation. We observed no elongation of axis II when the culture medium was depleted of nitrogen, whatever the added compounds: sucrose, BAP ( $1 \mu\text{M}$ ) or their combination (Fig. 8A). Moreover, the addition of asparagine (10 mM) to BAP ( $1 \mu\text{M}$ , Fig. 8B) did not induce axis II elongation. In contrast, the combination of sucrose and asparagine induced an efficient cumulated elongation (Fig. 8B and C), marked with the additional outgrowth of the two collateral buds after the addition of BAP ( $1 \mu\text{M}$ , Fig. 8B, D). However, the elongation was abolished in the presence of the cytokinin perception inhibitor LGR-991 ( $10 \mu\text{M}$ , Fig. 8B).

## Discussion

In accordance to previous studies (Furet et al., 2014), we found that a high nitrate level in the nutritive solution (12 mM) promotes the outgrowth of all axillary buds along the axis I 7 days after decapitation, which corresponds to the replacement of the strong nutrient sink apex by elongating axes II sinks (Fig. 2).

## Asparagine and sugars are involved in axis II nutrition and cytokinin metabolism

During spring flush, corresponding to bud outgrowth period, a close relationship is pointed out in the literature between shoot elongation and the transitory increase of amino acids content in the circulating sap and tissues (Millard et al., 1998; Guak et al., 2003). After decapitation, we also measured in our plant model an increase of amino acids contents in sap exudates. We found that proteinogenic amino acids such as asparagine, glutamate, serine, threonine, isoleucine and proline are accumulated in the sap (Fig. 3). Previous studies have reported asparagine as a major organic nitrogenous transport compound for growth (Kato, 1981; Tromp and Ovaas, 1979). Interestingly, GABA, a non-proteinogenic amino acid, also increases in the sap, as it is known to accumulate in response to stress (Kinnersley and Turano, 2000). Recently, it was reported that GABA could be high in the leaves after sink removal in soybean (Turner et al., 2012). These results show that apex removal affects nitrogen metabolism in roots, suggesting that amino acids synthesis from aspartate and glutamate pathways are enhanced. In accordance, we measured a transitory increase of the total amino acids in the different organ tissues (D7, Fig. 4A), mostly in the form of asparagine. Similarly, total amino acid content increased transitory in taproots of *Medicago sativa* after shoot removal (Hendershot and Volenec, 1993; Meuriot et al., 2003), in the stem tissue of mulberry trees during bud outgrowth, mainly as asparagine (Yamashita, 1990), or in *Brassica napus* after pod removal (Lee et al., 2016). In contrast, mostly proline, arginine, glutamine and asparagine accumulated during spring growth in 40 herbaceous perennial plant tissues (Sagisaka, 1987). Recent work has shown that asparagine metabolism is highly regulated in rice plants during the development of spikelets and that its concentration is lower than the aspartate one in both source and sink organs (Yabuki et al., 2017).

Previous studies have demonstrated that photosynthetic rate decreases or is not affected by sink removal (Plaut et al., 1987). In our conditions, no change in the photosynthetic activity of mature leaves in rose bush was observed after decapitation (Fig. S1), while sucrose content increased from a low value at D0 to a constantly high value at D7 and D14 (Fig. 4). It differs from the transitory increase of amino acid contents. This increase in sugar contents could be related to the removal of a strong sink as already demonstrated in soybean and in cotton (Kasai, 2008; Plaut et al., 1987).

We studied the involvement of the sap nitrogen-containing molecules into axis II elongation (Fig 4). We cultivated excised buds on a minimal medium (Murashige and Skoog, 1962) deprived of nitrogen that we supplemented with different sugars alone (sucrose, fructose or glucose) or in combination with nitrogen sources (nitrate, ammonium or individual amino acids). No axis II elongation was noted when sugars were solely supplied to the excised buds (Fig. 5, left). Combination of sucrose and nitrate or ammonium could not sustain axis II elongation (data not shown) when these molecules are individually added in the low physiological concentration found in the sap (Fig. 3D, right). In contrast, recent work has shown that deficiency in inorganic forms of nitrogen inhibits the

cell division occurring during elongation of axis II in rice (Luo et al., 2017). Moreover, previous studies have shown that high inorganic forms of nitrogen such as nitrate and ammonium, sustain axis II elongation *in vitro* in the presence of cytokinins and sucrose in spruce and are assimilated into amino acids (Bagh et al., 2004). A strong elongation occurred when 10 mM of asparagine, a concentration close to that found in the sap (Fig. 3), was given in combination with one of the sugars (Fig. 5). Asparagine alone, even at high concentration did not sustain axis II elongation in the absence of sucrose (Fig. S2). It is worth noting and quite surprising that no other amino acid could initiate significant elongation of axis II in the presence of sucrose (Fig. 5). A previous study in lupine, based on a <sup>15</sup>N-labeled asparagine and <sup>13</sup>C-labeled sucrose experiments, has shown that asparagine and sucrose are translocated in the axis II during elongation as nitrogen and carbon transporting molecules (Porter, 1981). Cline et al. (2006) highlighted the improvement of the axis II elongation after foliar spray of poplar trees with asparagine. Application of asparagine to the soil (10<sup>-5</sup> M) at the end of December sustains the vegetative growth in the following spring in olive trees (Proietti and Tombesi, 1996). These previous studies made in intact plants and thus in the presence of endogenous sugars highlighted the importance of asparagine in axis II elongation. The predominant role of asparagine *versus* the other amino acids in axis II elongation is quite striking and would require further analysis in the future to decipher the basis of this preference. A possible investigation may include the use of labelled amino acids to identify their fate in the different metabolic pathways during axis II elongation and the associated enzymatic activities.

No elongation occurred when cytokinins were solely supplied to the *in vitro* culture medium, alone or in combination with asparagine or sucrose (Fig. 8A and B), but their perception seems to be required even in the presence of these two molecules (perception inhibitor LGR-991, Fig. 8B). These results suggest that cytokinins trigger axis II elongation after bud outgrowth only in the simultaneous presence of an optimal nutritional context in rose. Indeed, cytokinin active forms were the highest in these conditions at D1 in the stem in the vicinity of the outgrowing buds (Fig. 7A). As previously mentioned in the literature, cytokinin content is well related to *IPT3* gene expression which encodes a key enzyme in cytokinin biosynthesis (Tanaka et al., 2006; Barbier *et al.*, 2015; Roman *et al.*, 2016). Furthermore, the slow-down of axis II elongation caused by high concentration of asparagine (30 mM) combined with sucrose (Fig. 6) could be related to an inhibitory effect of this amino acid on cytokinin production, as demonstrated in bean (Haroun et al., 2010). The main bud and its two collateral ones were able to grow out and to produce short axes II after direct addition of cytokinins (Fig. 8B), resulting in a significantly higher cumulated elongation than observed when asparagine was solely combined to sucrose. For a same nutrient supply in the *in vitro* medium, this phenotype could be related to the stimulating role of cytokinins, by increasing sink strength (Roitsch and Ehneß, 2000) in the three axes II and/or on the source aspect by increasing nitrogen mobilization (Criado et al., 2009).

Regarding to these last hypothesis concerning the probable involvement of reserve mobilization in axis II nutrition, we studied the origin of nitrogen and notably asparagine during elongation.

### **Asparagine in axis II comes mainly from new root uptake during elongation**

It is worth noting that nitrogen could originate from two different sources, the current nitrogen uptake and/or the nitrogen storage compound mobilization (Millard, 1996). Based on a  $^{15}\text{N}$  labelling experiments, we demonstrated that the percentage of nitrogen originated from the nitrate new root uptake in new axes gradually increased during the first week of elongation (54% at D4 and 85% at D7; Fig. 2D, E). These results are consistent with the well known transition from storage to new root uptake dependences for shoot growth in trees during spring flush (Nielsen et al., 1997; Tromp and Ovaa, 1976), or in herbaceous species during regrowth after shoot removal (Avice et al., 1996; Ourry et al., 1988). In our conditions, the storage dependant phase is very short, suggesting that nitrogen uptake is still efficient to support bud feeding after decapitation. This result could be explain by the high remaining leaf area and the high nitrate supply, as already demonstrated in alfalfa (Meuriot et al., 2004). Amino acids are the most valuable candidates to sustain axes II elongation in ligneous plants, since nitrogen assimilation occurred mainly in the roots (Gojon et al., 1994; Tromp and Ovaa, 1979). The 6-fold higher NRA (Fig. 3A) and the 15-fold higher nitrate content (Fig. 3B) in the roots compared to that observed in the shoot suggest that nitrogen assimilation also occurs in roots in *Rosa hybrida*. The low nitrate and ammonium content in the sap exudates supports this assumption (Fig. 3C, D). In accordance, we found that amino acids are the main nitrogen-containing molecules translocated from the roots (Fig. 3C, D). Glutamine, aspartate and asparagine were the three most abundant amino acids, as reported in cherry and poplar trees (Grassi et al., 2002) and privet shrub (Guérin et al., 2007). We found that glutamine and asparagine come in a large part from new nitrate root uptake during axis II elongation (Fig. 2F). Furthermore, our results also suggest that asparagine could be synthesized in roots and transported to the vicinity of the outgrowing buds during elongation. Indeed, we demonstrated that buds are unable to produce an efficient axis II elongation in the presence of asparagine precursors: aspartate and ammonium or glutamine (amide donor, Fig. 6). We therefore propose asparagine to be the major nitrogen-containing molecule involved in nitrogen supply of axes II allowing elongation in the presence of sugars.

### **Acknowledgments**

MALM was the recipient of a Ph.D. scholarship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, France. We thank Bénédicte Dubuc (Angers, IRHS, Arch-E team) and Christian Cattaneo (Angers, IRHS, INEM platform) for rose cutting production and plant care, Muriel Bahut (Angers, technical platform ANAN, SFR 4207 QuaSaV) for her help with the Zephir robot, Caroline Cukier (Angers, IRHS, SESaN team) for her help in amino acids analysis in sap and Pascale Satour (Angers, IRHS, SESaN team) for her help in sugars analysis in tissues and Nathalie Marnet (Le

Rheu, technical platform P2M2, INRA of Rennes) for her help in amino acids analysis in the tissues. We are most grateful to PLATIN (Plateau d'Isotopie de Normandie) core facility for all element and isotope analysis used in this study. Thanks to Soulaïman Sakr to fruitful discussions. Thanks to Department of Chemical Biology and Genetics (CRH, Palacky University, Czech Republic), Nathalie Leduc (Angers, IRHS, Arch-E team) for giving us the LGR-991 molecule. Synthesis of LGR-991 was supported by Grant LO1204 from the National Program of Sustainability from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic. We thank Eric Davies (North Carolina State University) for his kind help in English editing of the text.

## Figures

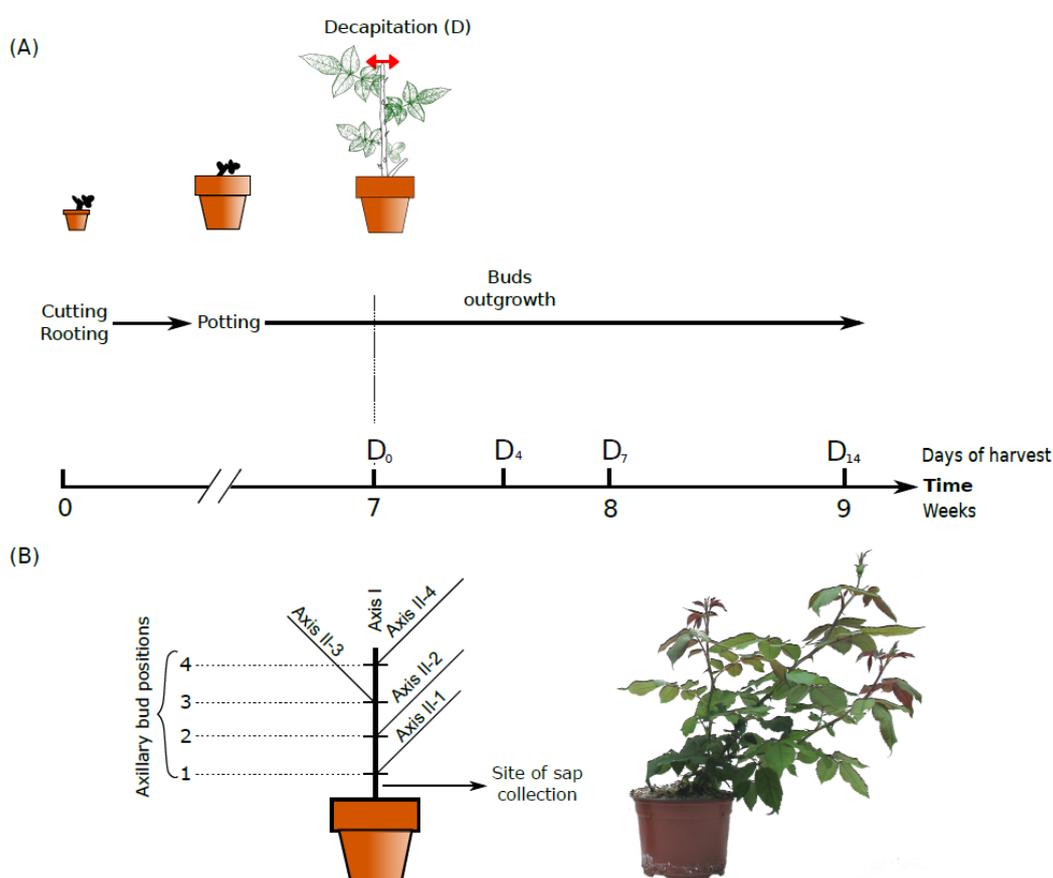


Fig. 1: *Rosa hybrida* plant model. Plants were taken from the glasshouse a week after potting (A) and were decapitated at the beginning of blooming initiation during the seventh week (D<sub>0</sub>). They received a high nitrate concentration (12 mM) in the nutrient solution during the whole experiment. Harvests took place one day (D<sub>1</sub>), a week (D<sub>7</sub>) or two weeks (D<sub>14</sub>) after beheading. Each axillary bud along the axis I was able to outgrowth and to produce secondary axis (axis II), numbered from bottom to top (B).

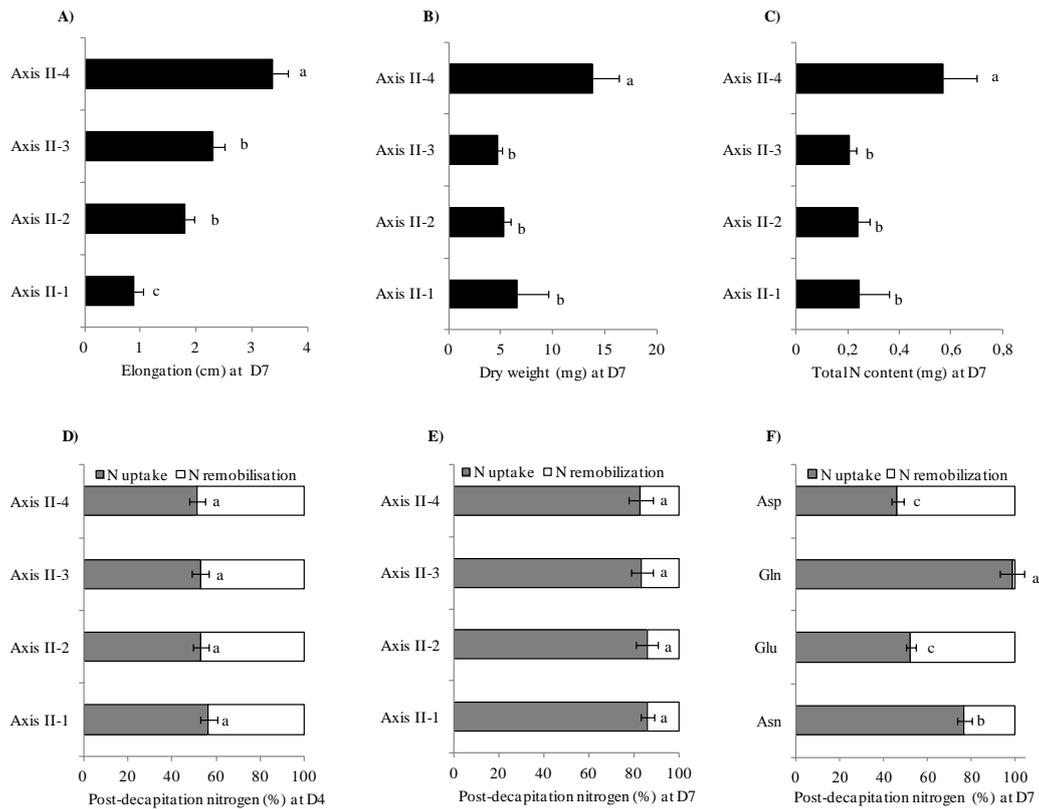


Fig. 2: *Rosa hybrida* secondary axis elongation (A), dry weight (B), total nitrogen contents (C) and post-decapitation nitrogen (%) in axis II according to their position along the axis I (Fig. 1B) in the presence of nitrate (12 mM) at four days (D4, D) and seven days (D7, E) after decapitation. Post-decapitation nitrogen (%) in predominant amino acids resulting from nitrate reduction and assimilation, in axis II at D7 (F). Nitrogen from current uptake is presented in grays bars, while non-labeled nitrogen incorporated before decapitation is presented in white bars. Each point is the average of three independent experiments  $\pm$  se. Different lowercase letters for each graph represent significant differences (Student and Newman-Keuls tests,  $P < 0.05$ ).

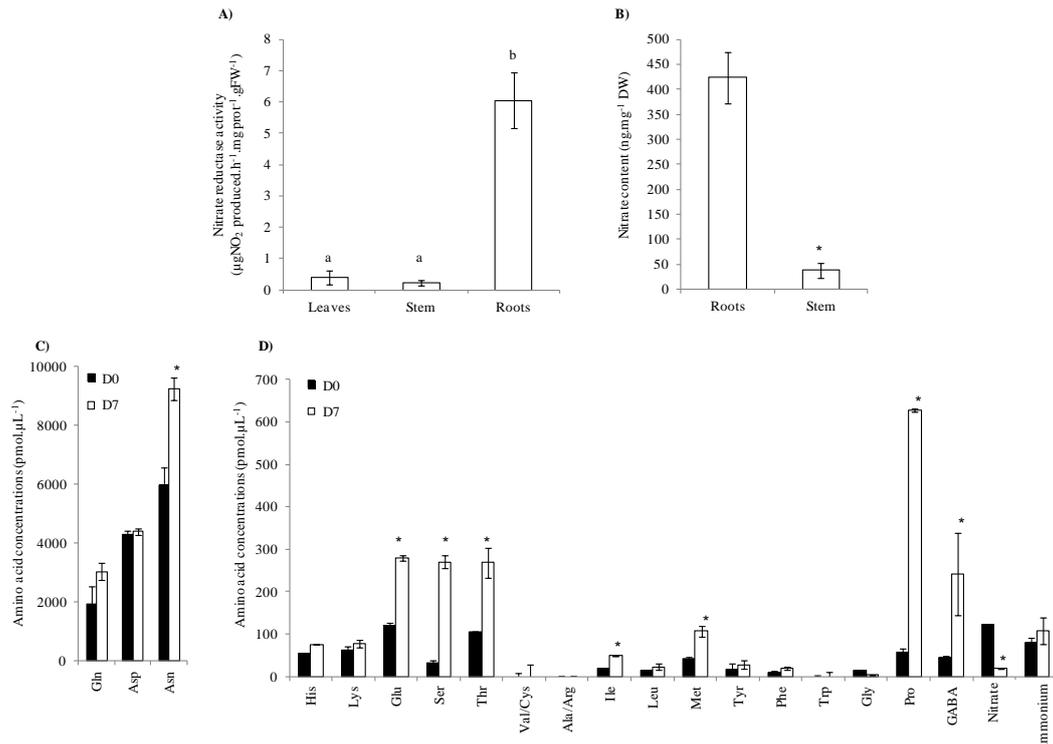


Fig. 3: root metabolism in *Rosa hybrida*. A) Nitrate reductase activity in the leaves, stem and root tissues at D0. Different lowercase letters represent significant differences between organs (Student and Newman-Keuls tests,  $P < 0.05$ ) on average of three independent experiments  $\pm$  se. B) Nitrate content in the stem and the roots tissues at D0. Stars indicate statistical differences between the two organs (Student test,  $P < 0.05$ ) on average of three independent experiments. Vertical bars indicate  $\pm$  standard error when larger than the symbol. C-D). Amino acid concentrations ( $\text{pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) in the total sap harvested below the most basal bud along the axis I before decapitation (D0, black bars) and a week after (D7, white bars). C) Amino acids highly concentrated (glutamine, aspartate and asparagine). D) Amino acids less concentrated, nitrate and ammonium. Stars indicate statistical differences between D0 and D7 for each molecule (Student test,  $P < 0.05$ ) on average of three independent experiments. Vertical bars indicate  $\pm$  standard error when larger than the symbol.

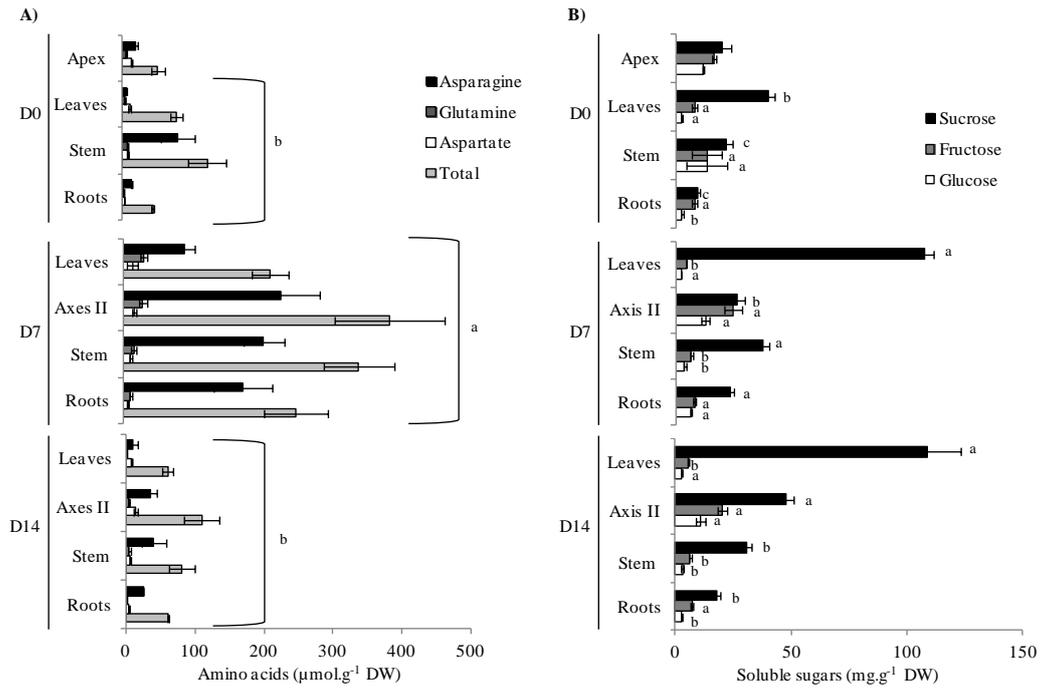


Fig. 4: amino acid contents (nmol.mg<sup>-1</sup> DW) in *Rosa hybrida* different organs (apex, leaves, axis II, stem and roots) at D0, D7 and D14 (A). Predominant amino acids (asparagine in black bars, glutamine in grey bars and aspartate in white bars) are individually presented, along with the total amino acids (“Total”, in hatched bars). Sucrose, glucose and fructose contents (mg.g<sup>-1</sup> DW) were also measured in the same tissues at the same kinetic points (B). Each point is the average of three independent experiments. Vertical bars indicate  $\pm$  standard error when larger than the symbol. Statistical analyses were performed on different organs for each molecule at the three kinetic points. Different lowercase letters represent significant differences (Student and Newman-Keuls tests,  $P < 0.05$ ). In A), each amino acid content of a given organ is not statistically different at D0 from the one at D14, but is not statistically different from the one at D7.

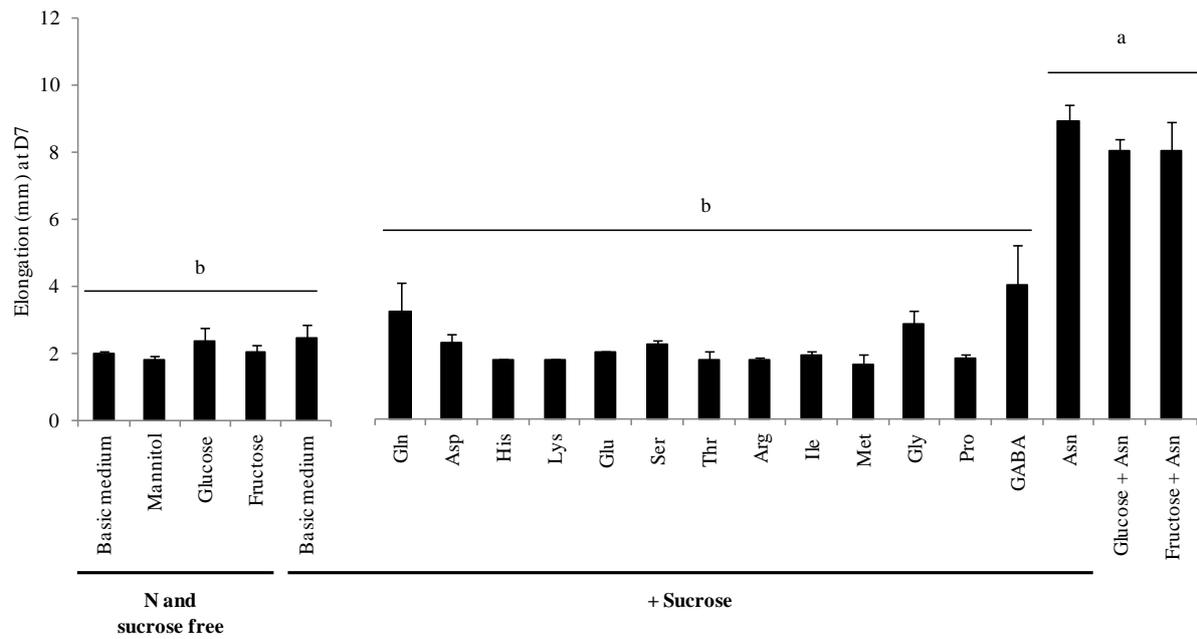


Fig. 5: elongation of median buds (position 2 and 3, Fig. 1B) collected on the axis I of *Rosa hybrida* and cultivated *in vitro* on agar basic medium supplemented with 10 mM of individual amino acids in the presence of sucrose, and in the presence of glucose or fructose (100 mM) with asparagine. Mannitol (100 mM) is used as a non-metabolizable osmotic control. Elongation is measured a week after decapitation (D7). Each point is the average of three independent experiments. Vertical bars indicate  $\pm$  standard error when larger than the symbol. Different lowercase letters represent significant differences (Student and Newman-Keuls tests,  $P < 0.05$ ).

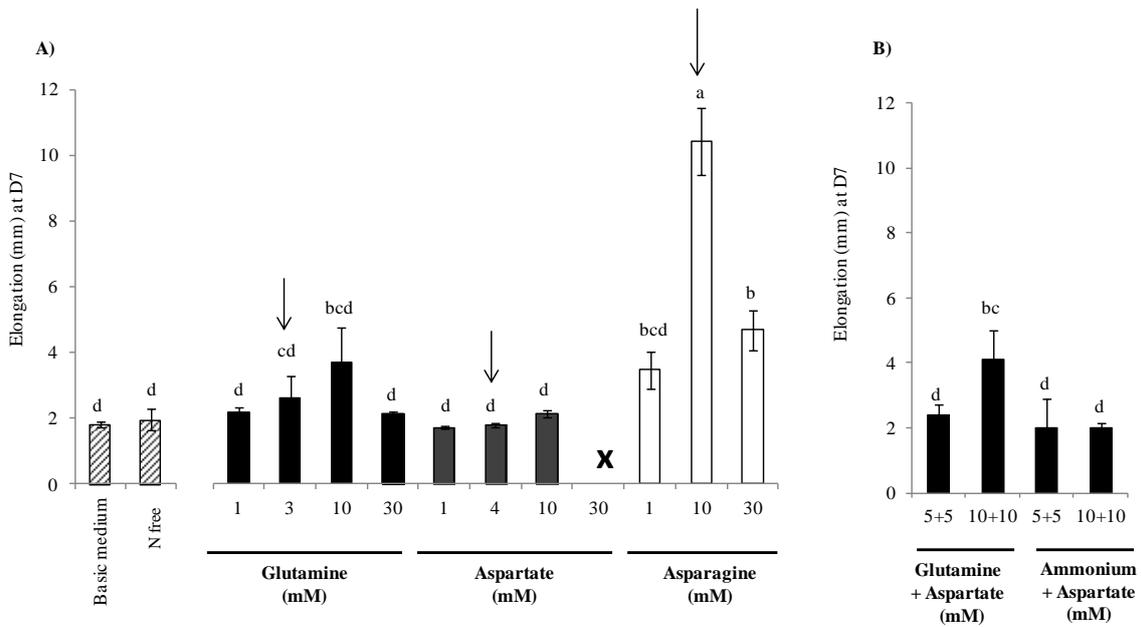


Fig. 6: elongation of median buds (position 2 and 3, Fig. 1B) collected on the axis I of *Rosa hybrida* and cultivated *in vitro* on an agar basic medium (light grey bars) supplemented with sucrose (100 mM) and increasing concentrations (0 mM to 30 mM) of glutamine (black bars), aspartate (gray bars) or asparagine (white bars) in presence of 100 mM of sucrose (A). The cross means that nodes became necrotic in presence of sucrose and 30 mM of aspartate. Arrows indicate the concentration of each amino acid in the sap (Fig. 3, glutamine: 3 mM, aspartate: 4 mM, asparagine: 10 mM). B) We tested combinations of glutamine and aspartate and combinations of ammonium and aspartate (5 mM or 10 mM each). Elongation was measured a week after decapitation (D7). Each point is the average of three independent experiments. Vertical bars indicate  $\pm$  standard error when larger than the symbol. Different lowercase letters in A) and B) represent significant differences (Student and Newman-Keuls tests,  $P < 0.05$ ).

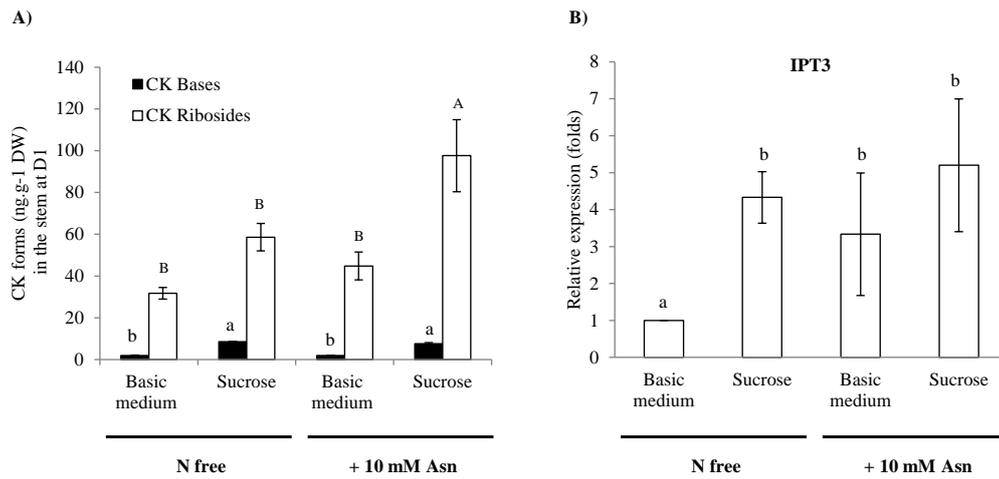


Fig. 7: cytokinin metabolism in *Rosa hybrida* stem tissue. A) Active forms of cytokinins (total CK bases and total CK ribosides, in black and white bars respectively) contents (ng.g<sup>-1</sup> DW) in stem tissue cultivated *in vitro* for 24 hours (D1) on a basic medium supplemented with sucrose (100 mM) and/or asparagine. B) Relative expression of *IPT3* gene. Different lowercase letters represent significant differences between the medium composition (for each cytokinin form in A); Student and Newman-Keuls tests,  $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ) on average of three independent experiments. Vertical bars indicate  $\pm$  standard error when larger than the symbol.

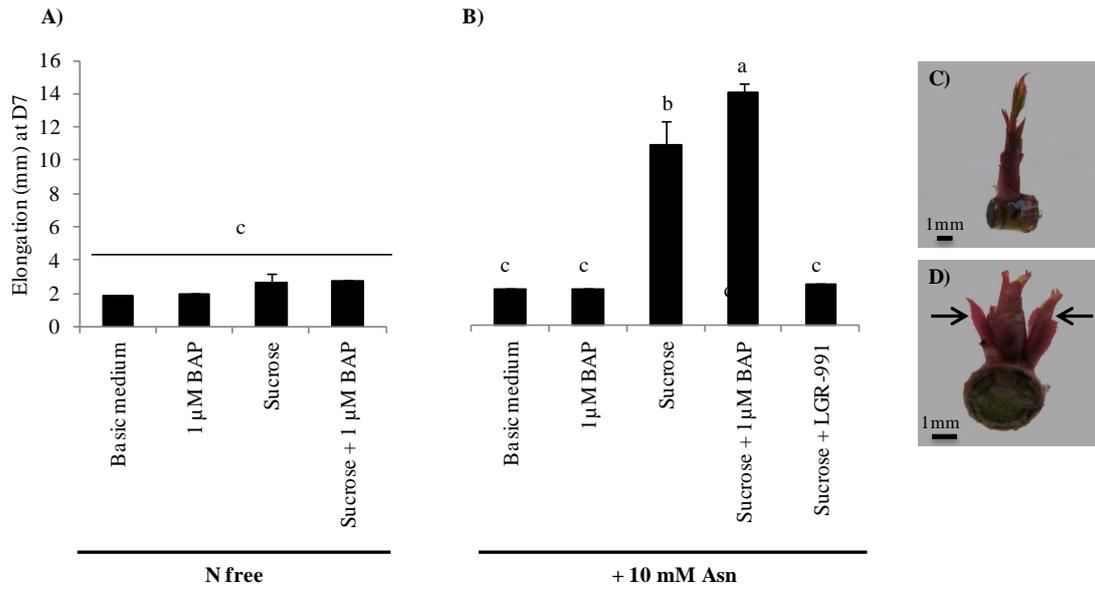


Fig. 8: elongation of median buds (position 2 and 3, Fig. 1B) collected on the axis I of *Rosa hybrida* and cultivated *in vitro* on (A) an agar basic medium supplemented with sucrose (100 mM) and/or with a synthetic form of cytokinins (6-Benzylaminopurine, BAP, 1  $\mu$ M). The BAP solvent (DMSO) was used as control, combined with the different studied molecules. The same combinations were tested in presence of asparagine (10 mM, B). Conversely, nodes were also cultivated in the simultaneous presence of asparagine (10 mM), sucrose (100 mM) and a CK perception inhibitor (LGR-991, 10  $\mu$ M, B). Two phenotypes of elongation were obtained after a week in presence of asparagine and sucrose (C) and combined with BAP (1  $\mu$ M, D). Arrows indicate the two collateral buds able to outgrowth in the simultaneous presence of these three molecules (cumulated elongation is presented in B). Each point is the average of three independent experiments. Vertical bars indicate  $\pm$  standard error when larger than the symbol. Different lowercase letters represent significant differences (Student and Newman-Keuls tests,  $P < 0.05$ ).

## Supplementary figures

Fig. S1: Photosynthetic activity has not increased at 7 days after decapitation.

Fig. S2: No elongation occurred when the basic medium was supplemented with different concentrations of asparagine in the absence of sucrose.

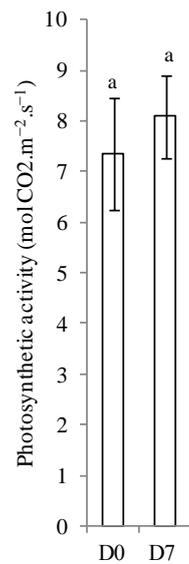


Fig. S1: photosynthetic activity of mature leaves at plant decapitation (D0) and a week after (D7), in *Rosa hybrida*. Each point is the average of 3 independent experiments  $\pm$  se. Different lowercase letters represent significant differences (Student and Newman-Keuls tests,  $P < 0.05$ ).

Photosynthetic activity is not modified (not increased) at 7 days after decapitation.

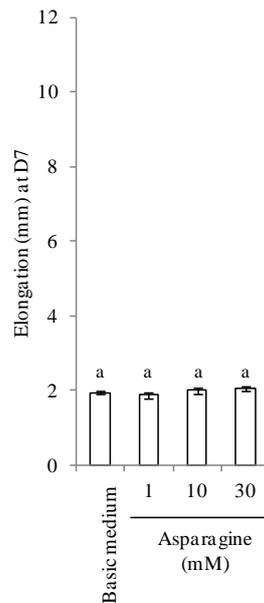


Fig. S2: elongation of median buds (position 2 and 3, Fig. 1B) collected on the primary axis of *Rosa hybrida* and cultivated *in vitro* on an agar basic medium supplemented with increasing contents of asparagine (0 mM to 30 mM) in the absence of sucrose. Elongation was measured a week after decapitation (D7). Each point is the average of 3 independent experiments  $\pm$  se. Different lowercase letters represent significant differences (Student and Newman-Keuls tests,  $P < 0.05$ ).

No elongation occurred when the basic medium was supplemented with different concentrations of asparagine in the absence of sucrose.

## References

- Avice, J.C., Ourry, A., Lemaire, G., Boucaud, J., 1996. Nitrogen and carbon flows estimated by  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  pulse-chase labeling during regrowth of alfalfa. *Plant Physiol.* 112, 281–290.
- Bagh, K., Hiraoki, T., Thorpe, T.A., Vogel, H.J., 2004. Nitrogen-15 NMR studies of nitrogen metabolism in *Picea glauca* buds. *Plant Physiol. Biochem.* 42, 803–809.
- Barbier, F., Peron, T., Lecerf, M., Perez-Garcia, M.-D., Barriere, Q., Rolcik, J., Boutet-Mercey, S., Citerne, S., Lemoine, R., Porcheron, B., Roman, H., Leduc, N., Le Gourrierec, J., Bertheloot, J., Sakr, S., 2015. Sucrose is an early modulator of the key hormonal mechanisms controlling bud outgrowth in *Rosa hybrida*. *J. Exp. Bot.* 66, 2569–2582.
- Berruyer, R., Poussier, S., Kankanala, P., Mosquera, G., Valent, B., 2006. Quantitative and qualitative influence of inoculation methods on *in planta* growth of rice blast fungus. *Phytopathology* 96, 346–355.
- Bobille, H., Limami, A.M., Robins, R.J., Cukier, C., Le Floch, G., Fustec, J., 2016. Evolution of the amino acid fingerprint in the unsterilized rhizosphere of a legume in relation to plant maturity. *Soil Biol. Biochem.* 101, 226–236.

- Bonhomme, M., Peuch, M., Ameglio, T., Rageau, R., Guillot, A., Decourteix, M., Alves, G., Sakr, S., Lacoite, A., 2010. Carbohydrate uptake from xylem vessels and its distribution among stem tissues and buds in walnut (*Juglans regia* L.). *Tree Physiol.* 30, 89–102.
- Brewer, P.B., Dun, E.A., Ferguson, B.J., Rameau, C., Beveridge, C.A., 2009. Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and Arabidopsis. *Plant Physiol.* 150, 482–493.
- Cataldo D.A., Haroon M., Schrader T.E. & Youngs V.L., 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 6, 71–80.
- Cline, M.G., Thangavelu, M., Dong-II, K., 2006. A possible role of cytokinin in mediating long-distance nitrogen signaling in the promotion of sylleptic branching in hybrid poplar. *J. Plant Physiol.* 163, 684–688.
- Criado, M.V., Caputo, C., Roberts, I.N., Castro, M.A., Barneix, A.J., 2009. Cytokinin-induced changes of nitrogen remobilization and chloroplast ultrastructure in wheat (*Triticum aestivum*). *J. Plant Physiol.* 166, 1775–1785.
- Dambrine, E., Martin, F., Carisey, N., Granier, A., Hällgren, J.E., Bishop, K., 1995. Xylem sap composition: A tool for investigating mineral uptake and cycling in adult spruce. *Plant Soil* 168, 233–241.
- Demotes-Mainard, S., Huché-Théliet, L., Morel, P., Boumaza, R., Guérin, V., Sakr, S., 2013. Temporary water restriction or light intensity limitation promotes branching in rose bush. *Sci. Hortic.* 150, 432–440.
- Dhont, C., Bertrand, A., Castonguay, Y., Cooke, J.E.K., Isabel, N., 2012. Tree size affects accumulation of carbon and nitrogen metabolites in white spruce seedlings during short day-induced bud formation. *Botany* 90, 941–953.
- Djennane, S., Hibrand-Saint Oyant, L., Kawamura, K., Lalanne, D., Laffaire, M., Thouroude, T., Chalain, S., Sakr, S., Boumaza, R., Foucher, F., Leduc, N., 2014. Impacts of light and temperature on shoot branching gradient and expression of strigolactone synthesis and signalling genes in rose. *Plant Cell Environ.* 37, 742–757.
- Domagalska, M.A., Leyser, O., 2011. Signal integration in the control of shoot branching. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 211–221.
- Dong, S., Scagel, C.F., Cheng, L., Fuchigami, L.H., Rygielwicz, P.T., 2001. Soil temperature and plant growth stage influence nitrogen uptake and amino acid concentration of apple during early spring growth. *Tree Physiol.* 21, 541–547.
- El Zein, R., Breda, N., Gerant, D., Zeller, B., Maillard, P., 2011. Nitrogen sources for current-year shoot growth in 50-year-old sessile oak trees: an *in situ* <sup>15</sup>N labeling approach. *Tree Physiol.* 31, 1390–1400.
- Ferguson, B.J., Beveridge, C.A., 2009. Roles for auxin, cytokinin, and strigolactone in regulating shoot branching. *Plant Physiol.* 149, 1929–1944.
- Foyer, C. H., Lescure, J. C., Lefebvre, C., Morot-Gaudry, J. F., Vincentz, M., & Vaucheret, H., 1994. Adaptations of photosynthetic electron transport, carbon assimilation, and carbon partitioning in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* plants to changes in nitrate reductase activity. *Plant Physiol.* 104, 171-178.

- Furet, P.-M., Lothier, J., Demotes-Mainard, S., Travier, S., Henry, C., Guérin, V., Vian, A., 2014. Light and nitrogen nutrition regulate apical control in *Rosa hybrida* L. *J. Plant Physiol.* 171, 7–13.
- Gambino, G., Gribaudo, I., 2006. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant RNA as internal control. *Phytopathology* 96, 1223–1229.
- Gaudin, Z., Cerveau, D., Marnet, N., Bouchereau, A., Delavault, P., Simier, P., Pouvreau, J.-B., 2014. Robust method for investigating nitrogen metabolism of <sup>15</sup>N labeled amino acids using AccQ•Tag Ultra Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry: Application to a Parasitic Plant–Plant Interaction. *Anal. Chem.* 86, 1138–1145.
- Geßler, A., Kopriva, S., Rennenberg, H., 2004. Regulation of nitrate uptake at the whole-tree level: interaction between nitrogen compounds, cytokinins and carbon metabolism. *Tree Physiol* 24, 1313–1321.
- Girault, T., Abidi, F., Sigogne, M., Pelleschi-Travier, S., Boumaza, R., Sakr, S., Leduc, N., 2010. Sugars are under light control during bud burst in *Rosa sp.*: photocontrol of sugars during bud burst. *Plant Cell Environ.* 33, 1339–1350.
- Gojon, A., Plassard, C., Bussi, C., 1994. Root/shoot distribution of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> assimilation in herbaceous and woody species, in: a whole plant perspective on carbon–nitrogen Interactions. pp. 131–147.
- Grassi, G., Millard, P., Wendler, R., Minotta, G., Tagliavini, M., 2002. Measurement of xylem sap amino acid concentrations in conjunction with whole tree transpiration estimates spring N remobilization by cherry (*Prunus avium* L.) trees. *Plant Cell Environ.* 25, 1689–1699.
- Guak, S., Neilsen, D., Millard, P., Wendler, R., Neilsen, G.H., 2003. Determining the role of N remobilization for growth of apple (*Malus domestica* Borkh.) trees by measuring xylem sap N flux. *J. Exp. Bot.* 54, 2121–2131.
- Guérin, V., Huché-Théliet, L., Charpentier, S., 2007. Mobilisation of nutrients and transport via the xylem sap in a shrub (*Ligustrum ovalifolium*) during spring growth: N and C compounds and interactions. *J. Plant Physiol.* 164, 562–573.
- Gulmon, S.L., Chu, C.C., 1981. The effects of light and nitrogen on photosynthesis, leaf characteristics, and dry matter allocation in the chaparral shrub, *Diplacus aurantiacus*. *Oecologia* 49, 207–212.
- Haroun, S.A., Shukry, W.M., El-Sawy, O., others, 2010. Effect of asparagine or glutamine on growth and metabolic changes in *Phaseolus vulgaris* under *in vitro* conditions. *Biosci Res* 7, 1–21.
- Harrison, R.B., Reis, G.G., Reis, M.D., Bernardo, A.L., Firme, D.J., 2000. Effect of spacing and age on nitrogen and phosphorus distribution in biomass of *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus pellita* and *Eucalyptus urophylla* plantations in southeastern Brazil. *For. Ecol. Manag.* 133, 167–177.
- Hayashi, H., Chino, M., 1990. Chemical composition of phloem sap from the uppermost internode of the rice plant. *Plant Cell Physiol.* 31, 247–251.
- Hayward, A., Stirnberg, P., Beveridge, C., Leyser, O., 2009. Interactions between Auxin and Strigolactone in Shoot Branching Control. *Plant Physiol.* 151, 400–412.

- Hendershot, K.L., Volenec, J.J., 1993. Nitrogen pools in taproots of *Medicago sativa* L. after defoliation. *J. Plant Physiol.* 141, 129–135.
- Huché-Théliier, L., Boumaza, R., Demotes-Mainard, S., Canet, A., Symoneaux, R., Douillet, O., Guérin, V., 2011. Nitrogen deficiency increases basal branching and modifies visual quality of the rose bushes. *Sci. Hortic.* 130, 325–334.
- Kasai, M., 2008. Effect of growing soybean plants under continuous light on leaf photosynthetic rate and other characteristics concerning biomass production. *J. Agron.* 7, 156–162.
- Kato, T., 1981. Major nitrogen compounds transported in xylem vessels from roots to top in citrus trees. *Physiol. Plant.* 52, 275–279.
- Kebrom, T.H., Mullet, J.E., 2015. Photosynthetic leaf area modulates tiller bud outgrowth in *sorghum*: Bud outgrowth is sensitive to leaf area. *Plant Cell Environ.* 38, 1471–1478.
- Keller, M., Koblet, W., 1995. Dry matter and leaf area partitioning, bud fertility and second season growth of *Vitis vinifera* L.: Responses to nitrogen supply and limiting irradiance. *VITIS-J. Grapevine Res.* 34, 77.
- Kinnersley, A.M., Turano, F.J., 2000. Gamma Aminobutyric Acid (GABA) and Plant Responses to Stress. *Plant Sci.* 19, 479–509.
- Le Roux, C., Del Prete, S., Boutet-Mercey, S., Perreau, F., Balagué, C., Roby, D., Fagard, M., Gaudin, V., 2014. The hnRNP-Q Protein LIF2 Participates in the Plant Immune Response. *PLoS ONE* 9, 1-16.
- Leduc, N., Roman, H., Barbier, F., Péron, T., Huché-Théliier, L., Lothier, J., Demotes-Mainard, S., Sakr, S., 2014. Light Signaling in Bud Outgrowth and Branching in Plants. *Plants* 3, 223–250.
- Lee, B.-R., Zhang, Q., Bae, D.-W., Kim, T.-H., 2016. Pod removal responsive change in phytohormones and its impact on protein degradation and amino acid transport in source leaves of *Brassica napus*. *Plant Physiol. Biochem.* 106, 159–164.
- Leprince, O., Satour, P., Vu, B.L., Buitink, J., 2004. The role of sugars and hexose phosphorylation in regulating the re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Cucumis sativa* and *Medicago truncatula*. *Physiol. Plant.* 122, 200–209.
- Li, X., Xia, K., Liang, Z., Chen, K., Gao, C., Zhang, M., 2016. MicroRNA393 is involved in nitrogen-promoted rice tillering through regulation of auxin signal transduction in axillary buds. *Sci. Rep.* 6, 1–12.
- Liao, S.-C., Lin, C.-S., Wang, A.-Y., Sung, H.-Y., 2013. Differential expression of genes encoding acid invertases in multiple shoots of Bamboo in response to various phytohormones and environmental factors. *J. Agric. Food Chem.* 61, 4396–4405.
- Li-Marchetti, C., Le Bras, C., Relion, D., Sakr, S., Morel, P., Crespel, L., 2015. Effects of Genotype× Environment Interaction on Plant Architecture in Rose. *ISHS Acta Hortic.*
- Liu, Y., Xu, J., Ding, Y., Wang, Q., Li, G., Wang, S., 2011. Auxin inhibits the outgrowth of tiller buds in rice (*Oryza sativa* L.) by downregulating OsIPT expression and cytokinin biosynthesis in nodes. *Aust. J. Crop Sci.* 5, 169.
- Lortie, C.J., Aarssen, L.W., 1997. Apical Dominance as an Adaptation in *Verbascum thapsus*: Effects of Water and Nutrients on Branching. *Int. J. Plant Sci.* 158, 461–464.

- Lu, Y.L., Xu, Y.C., Shen, Q.R., Dong, C.X., 2009. Effects of different nitrogen forms on the growth and cytokinin content in xylem sap of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings. *Plant Soil* 315, 67–77.
- Luo, L., Pan, S., Liu, X., Wang, H., Xu, G., 2017. Nitrogen deficiency inhibits cell division-determined elongation, but not initiation, of rice tiller buds. *Isr. J. Plant Sci.* 1–9.
- MacKenzie, D.J., McLean, M.A., Mukerji, S., Green, M., 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease* 81, 222–226.
- Malaguti, D., Millard, P., Wendler, R., Hepburn, A., Tagliavini, M., 2001. Translocation of amino acids in the xylem of apple (*Malus domestica* Borkh.) trees in spring as a consequence of both N remobilization and root uptake. *J. Exp. Bot.* 52, 1665–1671.
- Mason, M.G., Ross, J.J., Babst, B.A., Wienclaw, B.N., Beveridge, C.A., 2014. Sugar demand, not auxin, is the initial regulator of apical dominance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 6092–6097.
- Médiène, S., Pagès, L., Jordan, M.-O., Le Bot, J., Adamowicz, S., 2002. Influence of nitrogen availability on shoot development in young peach trees (*Prunus persica* L.). *Trees* 16, 547–554.
- Meuriot, F., Avice, J.-C., Decau, M.-L., Simon, J.-C., Lainé, P., Volenec, J.J., Ourry, A., 2003. Accumulation of N reserves and vegetative storage protein (VSP) in taproots of non-nodulated alfalfa (*Medicago sativa* L.) are affected by mineral N availability. *Plant Sci.* 165, 709–718.
- Meuriot, F., Avice, J.C., Simon, J.C., Laine, P., Decau, M.L., Ourry, A., 2004. Influence of initial organic N reserves and residual leaf area on growth, N uptake, N partitioning and N storage in Alfalfa (*Medicago sativa*) during post-cutting regrowth. *Ann. Bot.* 94, 311–321.
- Millard, P., 1996. Ecophysiology of the internal cycling of nitrogen for tree growth. *Z. Für Pflanzenernähr. Bodenkd.* 159, 1–10.
- Millard, P., Wendler, R., Hepburn, A., Smith, A., 1998. Variations in the amino acid composition of xylem sap of *Betula pendula* Roth. trees due to remobilization of stored N in the spring. *Plant Cell Environ.* 21, 715–722.
- Muller, B., Touraine, B., 1992. Inhibition of nitrate uptake by various phloem-translocated amino acids in *Soybean* seedlings. *J. Exp. Bot.* 43, 617–623.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497.
- Neilsen, D., Millard, P., Neilsen, G.H., Hogue, E.J., 1997. Sources of N for leaf growth in a high-density apple (*Malus domestica*) orchard irrigated with ammonium nitrate solution. *Tree Physiol.* 17, 733–739.
- Ourry, A., Boucaud, J., Salette, J., 1988. Nitrogen mobilization from stubble and roots during re-growth of defoliated perennial ryegrass. *J. Exp. Bot.* 39, 803–809.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Oxf. Univ. Press* 29, 1–6.
- Plaut, Z., Mayoral, M.L., Reinhold, L., 1987. Effect of altered sink: source ratio on photosynthetic metabolism of source leaves. *Plant Physiol.* 85, 786–791.
- Porter, N.G., 1981. The directional control of sucrose and asparagine transport in lupin by abscisic acid. *Physiol. Plant.* 53, 279–284.

- Proietti, P., Tombesi, A., 1996. Effects of gibberellic acid, asparagine and glutamine on flower bud induction in olive. *J. Hortic. Sci.* 71, 383–388.
- Rabot, A., Henry, C., Baaziz, K.B., Mortreau, E., Azri, W., Lothier, J., Hamama, L., Boumaza, R., Leduc, N., Pelleschi-Travier, S., Gourrierc, J.L., Sakr, S., 2012. Insight into the role of sugars in bud burst under light in the rose. *Plant Cell Physiol.* 53, 1068–1082.
- Roitsch, T., Ehneß, R., 2000. Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regul.* 32, 359–367.
- Roman, H., Girault, T., Barbier, F., Péron, T., Brouard, N., Pěňčík, A., Novák, O., Vian, A., Sakr, S., Lothier, J., Le Gourrierc, J., Leduc, N., 2016. Cytokinins are initial targets of light in the control of bud outgrowth. *Plant Physiol.* 172, 489–509.
- Sagisaka, S., 1987. Amino acid pools in herbaceous plants at the wintering stage and at the beginning of growth. *Plant Cell Physiol.* 28, 171–178.
- Spíchal, L., Werner, T., Popa, I., Riefler, M., Schmülling, T., Strnad, M., 2009. The purine derivative PI-55 blocks cytokinin action via receptor inhibition: PI-55 blocks cytokinin action. *FEBS J.* 276, 244–253.
- Tagliavini, M., Millard, P., Quartieri, M., Marangoni, B., 1999. Timing of nitrogen uptake affects winter storage and spring remobilisation of nitrogen in nectarine (*Prunus persica* var. 'Nectarina') trees. *Plant Soil* 211, 149–153.
- Takei, K., Sakakibara, H., Taniguchi, M., Sugiyama, T., 2001. Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant Cell Physiol.* 42, 85–93.
- Tanaka, M., Takei, K., Kojima, M., Sakakibara, H., Mori, H., 2006. Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *Plant J.* 45, 1028–1036.
- Thitithanakul, S., Pétel, G., Chalot, M., Beaujard, F., 2012. Supplying nitrate before bud break induces pronounced changes in nitrogen nutrition and growth of young poplars. *Funct. Plant Biol.* 39, 795–803.
- Thorpe, T.A., Bagh, K., Cutler, A.J., Dunstan, D.I., McIntyre, D.D., Vogel, H.J., 1989. A <sup>14</sup>N and <sup>15</sup>N nuclear magnetic resonance study of nitrogen metabolism in shoot-forming cultures of white spruce (*Picea glauca*) buds. *Plant Physiol.* 91, 193–202.
- Tromp, J., Ova, J.C., 1979. Uptake and distribution of nitrogen in young apple trees after application of nitrate or ammonium, with special reference to asparagine and arginine. *Physiol. Plant.* 45, 23–28.
- Tromp, J., Ova, J.C., 1976. Effect of time of nitrogen application on amino-nitrogen composition of roots and xylem sap of apple. *Physiol. Plant.* 37, 29–34.
- Tromp, J., Ova, J.C., 1971. Phloem translocation of storage nitrogen in apple. *Physiol. Plant.* 25, 407–413.
- Turner, G.W., Cuthbertson, D.J., Voo, S.S., Settles, M.L., Grimes, H.D., Lange, B.M., 2012. Experimental sink removal induces stress responses, including shifts in amino acid and phenylpropanoid metabolism, in soybean leaves. *Planta* 235, 939–954.

- Visser, R.D., Vianden, H., Schnyder, H., 1997. Kinetics and relative significance of remobilized and current C and N incorporation in leaf and root growth zones of *Lolium perenne* after defoliation: assessment by  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  steady-state labelling. *Plant Cell Environ.* 20, 37–46.
- Xu, J., Zha, M., Li, Y., Ding, Y., Chen, L., Ding, C., Wang, S., 2015. The interaction between nitrogen availability and auxin, cytokinin, and strigolactone in the control of shoot branching in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep.* 34, 1647–1662.
- Yabuki, Y., Ohashi, M., Imagawa, F., Ishiyama, K., Beier, M.P., Konishi, N., Umetsu-Ohashi, T., Hayakawa, T., Yamaya, T., Kojima, S., 2017. A temporal and spatial contribution of asparaginase to asparagine catabolism during development of rice grains. *Rice* 10, 1-10.
- Yamashita, T., 1990. Variations in amounts of carbohydrates, amino acids and adenine nucleotides in mulberry tree (*Morus alba* L.) stems during transitional phases of growth. *Tree Physiol.* 6, 191–200.
- Zhao, D., Reddy, K.R., Kakani, V.G., Reddy, V.R., 2005. Nitrogen deficiency effects on plant growth, leaf photosynthesis, and hyperspectral reflectance properties of sorghum. *Eur. J. Agron.* 22, 391–403.





# Thèse de Doctorat

Marie-Anne LE MOIGNE

Implication de l'azote dans le débourrement des bourgeons et l'allongement des axes qui en sont issus chez *Rosa hybrida*

Nitrogen involvement in bud outgrowth and secondary axis elongation in *Rosa hybrida*

## Résumé

Le débourrement des bourgeons axillaires conditionne la ramification, donc l'établissement de l'architecture chez les végétaux. L'azote est impliqué dans la croissance des jeunes organes tels que les axes secondaires (axes II) issus du débourrement des bourgeons. Plusieurs études ont démontré que la concentration en acides aminés augmente dans la sève au cours de la reprise de croissance printanière, dont le débourrement des bourgeons est une étape importante. L'identité et l'origine des acides aminés impliqués dans le débourrement et les premières phases d'allongement des axes II n'ont pourtant pas encore été clairement établies. Ce travail a pour objectif de comprendre, chez *Rosa hybrida*, les phénomènes nutritionnels sous-jacents à l'apparition de différents phénotypes de ramification. Pour ce faire, nous avons fait varier la concentration et les périodes d'apport de nitrate dans la solution nutritive au cours de la croissance, avant et après l'initiation du débourrement par décapitation. Nous avons montré *in planta* que la concentration d'asparagine augmente dans la sève et dans l'ensemble des tissus pendant l'allongement des axes II et provient tout d'abord majoritairement des réserves puis, après la décapitation, en quantité de plus en plus importante de l'absorption courante. Cet acide aminé est le seul capable, en présence de sucres, d'initier une croissance efficace des axes II *in vitro*, notamment en contribuant à placer le statut des régulateurs de croissance dans un contexte favorable au débourrement. Une approche par RNAseq a mis en évidence 848 séquences potentiellement impliquées dans le débourrement en réponse au nitrate. Parmi elles, le couple Asparaginase / Asparagine synthétase s'exprime respectivement durant la phase de dormance ou le débourrement, ce qui renforce l'importance de l'asparagine dans ce phénomène. Ces deux échelles d'approche ont permis de compléter le modèle intégratif du débourrement en intégrant la nutrition des nouveaux organes.

**Mots clés :** asparagine, azote, nutrition, ramification, sucres.

## Abstract

Axillary bud outgrowth is an essential process of plant branching to set-up its architecture. Nitrogen is implicated in the development of young organs such as secondary axes (axes II) resulting from bud outgrowth. Several studies have previously shown that amino acid concentration increase in the xylem sap during spring regrowth whom bud outgrowth is an essential step. The exact nature of the amino acids implicated in the bud outgrowth and initial axe II elongation have not yet been determined. The present work aims to understand in *Rosa hybrida* the nutrition processes implicated in the set-up of different branching phenotypes. To achieve this goal, we brought different nitrate concentrations to the plant before and after bud outgrowth initiation by apex removing. We showed *in planta* that asparagine concentration increases in the sap and in the tissues during axes II growth, initially originating from internal stores and, after decapitation, increasingly coming from current uptake. This amino acid is the sole able to evoke *in vitro* an efficient elongation of axes II in the presence of sugar through the establishment of growth regulators metabolism status that is favorable to the outgrowth process. Transcriptome study using RNAseq features 848 sequences that are potentially implicated in bud outgrowth in response to nitrate. Among them, the expression of Asparaginase takes place during dormancy while, in contrast, Asparagine synthase gene is active during bud outgrowth, highlighting the importance of asparagine in this phenomenon. These approaches conducted at two different scales contribute to append with nitrogen nutrition the integrated model of bud outgrowth.

**Key words :** asparagine, nitrogen, nutrition, branching, sugars.