



**HAL**  
open science

# Effet d'un rapport de Silicium sur la senescence foliaire et les performances agronomiques du colza

Cylia Haddad

► **To cite this version:**

Cylia Haddad. Effet d'un rapport de Silicium sur la senescence foliaire et les performances agronomiques du colza. Sciences agricoles. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMC270 . tel-02159553

**HAL Id: tel-02159553**

**<https://theses.hal.science/tel-02159553>**

Submitted on 18 Jun 2019

**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.



Normandie Université

## THÈSE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**

**Spécialité SCIENCES AGRONOMIQUES, BIOTECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES**

**Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie**

**Effet d'un rapport de Silicium sur la senescence foliaire et les performances agronomiques du colza**

**Présentée et soutenue par  
Cylia HADDAD**

**Thèse soutenue publiquement le 17/12/2018  
devant le jury composé de**

Mme CÉLINE MASCLAUX-DAUBRESSE	Directeur de recherche à l'INRA, INRA de Versailles	Rapporteur du jury
M. JEAN-DOMINIQUE MEUNIER	Directeur de recherche, CEREGE	Rapporteur du jury
M. MUSTAPHA ARKOUN	Docteur, Centre Mondial de l'Innovation CMI	Membre du jury
M. ALAIN OURRY	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Président du jury
M. PHILIPPE ETIENNE	Maître de conférences HDR, Université Caen Normandie	Directeur de thèse
M. PHILIPPE LAINE	Maître de conférences HDR, Université Caen Normandie	Co-directeur de thèse

**Thèse dirigée par PHILIPPE ETIENNE et PHILIPPE LAINE, Écophysiologie végétale, agronomie et nutritions N.C.S. (Caen)**



UNIVERSITÉ  
CAEN  
NORMANDIE



Normandie de Biologie Intégrative,  
Santé, Environnement





*À mes très chers parents, Karim et Hassina;  
Mon seul frère Juba  
Et bien sûr mes sœurs Siham, Zara et Anaïs.  
Merci, sans vous ceci ne se serait jamais réalisé.*



## Remerciements

*Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries.*

Marcel Proust

Ces trois dernières années (dans la continuité des deux qui ont précédé) furent pour moi riche de nombreuses rencontres formidables. J'espère réussir à remercier tout le monde dans ces quelques lignes.

Pour commencer, je souhaiterais remercier **Marie-Pascale Prud'homme**, la directrice du laboratoire UMR INRA-UniCaen 950 EVA, ainsi que **Philippe Lainé**, directeur adjoint. Merci de m'avoir accueillie au sein du laboratoire durant ces cinq années. **Marie-Pascale**, un très grand merci pour ton soutien tout au long de cette thèse, pour tous tes conseils avisés et tous nos échanges, je ne saurais dire combien ils m'ont été précieux. Merci à toi **Philippe**, pour l'appui que tu m'as apporté et la pertinence de tes observations.

Je suis très honorée que **Jean-Dominique Meunier** et **Céline Masclaux-Daubresse** aient accepté d'être rapporteurs de mon travail, je vous remercie beaucoup. Mes remerciements se tournent également vers **Alain Ourry** et **Mustapha Arkoun** pour avoir accepté d'être examinateurs de ce travail de thèse.

Mes remerciements vont naturellement à mes directeurs de thèse, **Philippe Etienne** et **Philippe Lainé**, sans qui ce travail n'aurait probablement pas vu le jour. Merci à vous d'avoir cru en moi depuis plus de 5 ans. Les mots ne suffisent pas pour exprimer ma reconnaissance et ma gratitude envers vous. Un énorme merci pour vos conseils, le temps que vous m'avez consacré, votre disponibilité malgré vos emplois du temps plus que chargés, merci également pour les nombreuses heures de corrections et de relecture. Votre rigueur scientifique et votre clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront des moteurs de mon travail de chercheur, merci de m'avoir transmis la passion de la recherche.

Une autre personne, sans qui rien de tout cela ne se serait réalisé est sans doute toi **Mustapha Arkoun**, merci de m'avoir accordé cette merveilleuse chance de réaliser une thèse, et pour avoir cru en moi tout au long de mes stages (M1 et M2) et de cette thèse. Merci également pour ton soutien décisif, pour ton encouragement infailible et pour tes conseils avisés de chaque instant qui m'ont toujours poussé vers le haut, et permis d'évoluer et de m'améliorer. Merci également pour le temps que tu m'as accordé, et ta disponibilité. Je te suis tellement reconnaissante.



Je remercie également **Jacques Trouverie**, merci pour tes nombreux conseils et ton aide précieuse notamment dans le traitement des données RNAseq. Merci d'avoir toujours été présent et d'avoir continuellement répondu à mes questions même quand tu étais overbooké.

Mes remerciements s'adressent également à **Isabelle Mussio** et à **Juliette Fauchot**, j'ai énormément appris auprès de vous, merci pour vos conseils, vos encouragements lors de ma première expérience dans l'enseignement. Grâce à vous j'ai apprécié d'enseigner et j'en garde un très bon souvenir. Une petite phrase de remerciement pour mes étudiants pour avoir fait preuve de maturité lors des TP et TD malgré votre jeune âge, j'espère avoir réussi à vous transmettre ma passion pour la recherche, qui sait peut-être que l'un d'entre vous lira ma thèse !

Je tiens aussi à adresser mes remerciements à **Nathalie Nési**, qui m'a chaleureusement accueillie au sein du labo IGEP de l'INRA de Rennes, merci pour vous être rendue disponible et pour votre précieuse aide pour les analyses NIRS. Merci également à **Didier Goux** et à **Nicolas Elie** pour leur contribution dans mes recherches de cristaux de silice, j'ai énormément apprécié nos échanges, notamment sur la recherche et l'Après thèse.

Place à la « team EVA », je remercie énormément **Jean-Christophe, Jacques, Philippe E, Philippe L, Servane, Sylvain, Alain, Annette, Sophie BM, Marie-Pascale, Frederik LD, Frédéric M et Jean-Bernard** pour les enseignements que vous m'avez apportés tout au long de mon cursus universitaire effectué en France. Vous avez fortement contribué à mon orientation vers un master recherche. Merci à **Jean Bernard** pour les séances d'atelier doctorant qui sont très constructives. Elles m'ont été d'une très grande aide, notamment les nombreux échanges qui m'ont permis de mieux m'approprier mon sujet de thèse.

Un grand merci aux Platinettes, merci pour la bonne humeur que vous avez apporté au labo: **Josette, Frederine, Fanny** et **Jéhane**. Un immense merci à toi **Josette**, pour ton soutien et merci d'avoir su me remonter le moral quand ça n'allait pas, tu as su trouvé les mots qu'il fallait et je t'en suis reconnaissante. Merci également pour ton aide précieuse lors des micro pesées. Un grand merci à **Frederine** pour les nombreuses analyses IRMS réalisé en un temps record, merci pour ton efficacité. **Fanny**, je te remercie pour ton aide précieuse lors des nombreuses minéralisations et surtout merci pour le traitement de mes nombreux résultats ICP-MS. **Jéhane**, je te remercie pour ton aide dans les analyses IRMS et pour tous les échanges et moments agréables surtout pendant la période estivale où le laboratoire est désertique. Sans oublié **Manu**, merci pour ton humour et ta gentillesse.

Je tiens à remercier particulièrement **Anne-Françoise**, tu as été pour moi d'une aide incomparable, merci pour ton aide à la serre, notamment lors des repiquages et lors des préparations des litres et des litres de solutions nutritives, je te remercie également d'avoir toujours été là pour moi pendant les moments difficiles (et les bons moments aussi !), merci de m'avoir prêté une oreille et m'avoir incité à toujours prendre les choses du bon côté.





Merci à toi **Olivier** pour ton aide précieuse lors de mes récoltes et merci de t'être occupé de mes plantes aux cases lysimétriques. Je remercie également **Josiane** pour son aide dans mes récoltes et pour les préparations des solutions nutritives.

Merci à **Patrick**, pour ton aide notamment dans les mesures de LICOR et surtout merci pour avoir résolu mes soucis de PC lors de la perte de mes données.

Merci à la team Chic-Choc, pour la bonne humeur que vous apportez en salle café. **Julie**, merci beaucoup pour ton aide précieuse en biologie moléculaire, et surtout pour ton aide lors de mes nombreux broyages à l'azote liquide. **Magalie**, je te remercie beaucoup pour les broyages et pour ton aide à toutes mes récoltes.

Comment rédiger cette partie sans remercier les **DOC'S**, Merci à tous les **doc's** pour tous les moments partagés au labo ou en dehors, Merci à **Maxence** et à **Aurélia** pour toutes les soirées organisées, grâce à vous, j'ai passé de merveilleux moments. Grâce à toi **piou-piou**, j'ai fait la découverte du « déserteur »! Je pense que vous connaissez tous mon avis hihi, Merci maxou d'avoir sacrifié ton bar préféré rien que pour que j'arrête de me plaindre hihi, je n'ai pas oublié, promis je vais organiser une soirée avant la soutenance !

**Marinette**, merci pour la douceur et la bonne humeur que tu as apporté au labo et au bureau durant mon stage de Master et ma 1<sup>er</sup> année de thèse, toujours le sourire aux lèvres, tu nous as montré l'exemple à suivre pour finir la thèse dans les temps. Je remercie également **Aurélia**, qui fait incontestablement partie de la team des **doc's**, merci pour la bonne humeur que tu véhicule au quotidien. **Elise**, merci pour tes conseils, notamment au début de la thèse et merci pour ton chauffage bienfaiteur.

Mes remerciements vont tout naturellement aux « piou-pious », **Maxence** et **Emilie**, mes alliés de l'aventure thèse qui a commencé au même moment pour nous trois et s'achève aussi en même temps, nous formons une team qui déchire ! (vive la team piou-piou !). Je vous remercie déjà pour m'avoir écouté me plaindre un peu beaucoup! « Je dis juste ce que je pense **maxou** hihi », merci pour toutes les discussions, les rigolades et j'en passe, merci pour vos conseils qui m'ont fait énormément relativiser surtout en ce moment de rédaction. Les nouveaux **doc's** (qui ne le sont plus vraiment) **Charlotte**, **Victor**, **Hans** et **Antoine** qui s'est incrusté de force (et c'est tant mieux)! Merci pour la bonne humeur et la joie de vivre que vous avez diffusé, merci pour tous les bons moments partagés à la pause de 16h, la fameuse phrase « c'est le l'heure du goûté » va trop me manquer. Les remerciements des doc's seraient incomplet si je n'adressais pas quelques mots aux nouveaux « piou-pious » **Galatée**, **Hanh**, **Aurélien** et **Momo**, je vous souhaite à chacun une thèse passionnante, j'espère que vous prendrez bien soin de la bonne ambiance qui règne dans le bureau des doc's.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous mes amis (**Imane**, **Mima**, **Lamine** « **Laminozaure** », **Hakim**, **Nacer** et **Malya** ) qui m'ont apporté énormément de choses en plus du soutien moral pendant ces années d'études, je les en remercie sincèrement.



**Joëlle et Moustapha**, « ma famille adoptive de France », je ne vous remercierai jamais assez, vous m'avez accueillie chez vous, accompagné, aidé, soutenu et encouragé depuis mon arrivée en France et je vous en remercie sincèrement. **Yacine**, mon mentor à Caen, comment te remercier ! Tu as tellement fait pour moi que je ne sais même pas par où commencer! Un immense merci pour tout.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille, et en particulier à mes parents qui m'ont fait comprendre que la vie n'est pas faite que de problèmes. Malgré mon éloignement depuis de (trop) nombreuses années, leur confiance, leur tendresse, leur amour me portent et me guident tous les jours. Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Est-ce le bon endroit pour dire ce genre de choses? Je n'en connais en tous cas pas de mauvais. Je vous aime.

**Mon papa**, mon modèle, toi qui as toujours été ma source d'inspiration, les mots ne sont pas assez forts pour exprimer ma profonde reconnaissance, Je te remercie beaucoup pour ton soutien infailible, pour ta présence, tes encouragements, tu as toujours su trouver les mots qui font que je me relève à chaque fois, Merci pour les bonnes valeurs que tu m'as transmises, je n'y serais jamais arrivé sans toi, je te dois tout, tu as fait de moi la femme que je suis aujourd'hui, merci de m'avoir sans cesse poussé vers le haut. À présent je peux te répondre à ta fameuse phrase « on y arrivera ma fille » par « on y arriver mon papa! ».

**Ma maman**, ma source de tendresse et d'inspiration, je ne te remercierai jamais assez, tu as toute ma gratitude, merci pour ton soutien, bien que tu sois loin de moi, ton attention et tes encouragements ont toujours été mon moteur et ma source d'énergie.

Un immense merci à mon unique frère **JUBA**, merci pour ton soutien, que ce soit pendant mes travaux de thèse ou pendant mes nombreux moments difficiles. Comment ne pas remercier mes sœurs, mes anges gardiens. Vous êtes ce que j'ai de plus cher, **Zara « mon ange »** comment te remercier ! Je ne sais même pas par où commencer, ton soutien est inégalé, tu trouves toujours le moyen de me faire relativiser, je te dois tellement de choses! Mille mercis pour ta présence, ton amour, merci d'avoir été là pour moi dans les bons moments et les moins bons (et Dieu sait qu'il y en avait pas mal), ma vie n'aurait jamais de sens sans toi ma jumelle. **Siham**, ma belle, tu es la personne la plus gentille et la plus serviable que je connaisse, je te remercie énormément pour ton soutien et ta présence, tu es mon pilier, merci d'avoir toujours été là pour moi, tu seras une maman géniale ! **Anaïs**, mon petit bébé, la petite dernière, tu as illuminé ma vie, à chaque fois que je te vois, je vois toutes ces années que j'ai raté, tu as grandi tellement vite ! Mais tu resteras toujours mon petit bébé!



## Liste des abréviations

---

### A

---

**ADN (DNA):** Acide désoxyribonucléique  
**ANOVA:** Analyse de variance  
**ARN (RNA):** Acide ribonucléique  
**RNAseq:** "RNA sequencing"  
**AMT:** "Ammonium Transporter"  
**ATP:** Adénosine triphosphate  
**ARF:** "Auxine Response Factor"  
**ABA:** "Abscisic Acid"

---

### B

---

**BR:** Brassinostéroïde

---

### C

---

**C:** Carbon  
**Cab:** "Chlorophyll a/b binding protein"  
**CHATS:** "Constitutive high affinity transport system"  
**CK:** Cytokinine  
**CLATS:** "Constitutive low affinity transport system"  
**CMI:** Centre Mondial de l'Innovation  
**Ct:** Cycle Threshold

---

### D

---

**D:** Day

---

### E

---

**EAA (NAE):** Efficience d'assimilation de l'azote  
**EAbA (NUpE):** Efficience d'absorption de l'azote  
**EDTA:** Ethylène diamine tétra acétique  
**ERA (NRE):** Efficience de remobilisation de l'azote

**ET:** Etylène

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

**EF:** "Elongation Factor"

---

### F

---

**FPS:** Farnesyl diphosphate Synthase

---

### G

---

**GA:** Gibbérellines

---

### H

---

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peroxyde d'hydrogène  
**ha:** Hectare  
**HXK:** Hexokinase

---

### I

---

**IAA:** "Indole acetic acid", Auxine  
**IHATS:** "Inducible high affinity transport system"  
**ILATS:** "Inducible low affinity transport system"  
**IRMS:** "Isotope ratio mass spectrometry"  
**HR-ICPMS:** "High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry"  
**IPT:** isopentenyltransferase

---

### J

---

**JA:** "Jasmonic Acid"

---

### L

---

**LiCl:** Lithium Chloride



**Lsi:** "Low Silicon"

---

**M**

---

**MS:** Matière sèche

---

**N**

---

**N:** Nitrogen, Azote

**NRT :** "Nitrate Root Transporter"

**MDA:** Malondialdéhyde

---

**O**

---

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup> :** Anion superoxyde

**OH<sup>•</sup> :** Hydroxyle

**OsLSi:** "*Oryza ativa* Low Silicon Rice"

---

**P**

---

**P:** Phosphore

**PAR:** "Photosynthetically Active Radiation"

**PCR:** "Polymerase Chain Reaction"

**PPO:** Polyphénoloxydases

**POX:** Peroxydases

**PAL:** Phenylalanine ammonia-lyase

---

**Q**

---

**Q-PCR:** PCR quantitative

---

**R**

---

**ROS: V**Reactive oxygen speciesV, Espèce réactive de l'oxygène

**RT :** Reverse Transcription

**RPK:** "Receptor-like kinase gene"

---

**S**

---

**SA:** "Salicylic Acid"

**SAGs:** "Senescence associated genes"

**SDGs:** "Senescence downregulated genes"

**SE:** "Standard error", Erreur standard

**Si:** "Silicon", Silicium

**SL:** Strigolactones

**SPAD:** "Soil plant analysis development"

**SAUR:** "SMALL AUXIN UP RNA Gene"

**SL:** Strigolactones

---

**T**

---

**TSA:** Tryptophane Synthase





**Sommaire****Introduction générale ..... 1****Chapitre I : Synthèse bibliographique..... 5**

<b>I. Généralité sur le colza.....</b>	<b>5</b>
<b>I.1. Cycle de développement .....</b>	<b>5</b>
<b>I.2. La nutrition azotée.....</b>	<b>5</b>
a. L'Effizienz d'Absorption de l'Azote (EAbA) : .....	5
b. L'Effizienz d'Utilisation de l'Azote (EUtA) : .....	6
<b>I.3. Sénescence foliaire et remobilisation de l'azote .....</b>	<b>7</b>
<b>I.3.A. Définition de la sénescence : .....</b>	<b>7</b>
<b>I.3.B. Les différents types de sénescence .....</b>	<b>7</b>
a. La sénescence séquentielle .....	7
b. La sénescence monocarpique.....	7
<b>I.3.C. Modifications physiologiques, biochimiques et moléculaires associées à la sénescence .....</b>	<b>8</b>
<b>I.3.C.1. La phase d'initiation de la sénescence .....</b>	<b>8</b>
<b>I.3.C.2. La phase de réorganisation de la sénescence .....</b>	<b>8</b>
<b>I.3.C.3. Phase terminale de la sénescence .....</b>	<b>10</b>
<b>I.3.D. Régulation de la sénescence séquentielle .....</b>	<b>11</b>
<b>1. Facteurs endogènes .....</b>	<b>11</b>
a. Les glucides et rapport C:N.....	11
b. Les hormones .....	12
<b>2. Facteurs exogènes .....</b>	<b>17</b>
<b>II. Le silicium .....</b>	<b>18</b>
<b>II.1. Le silicium dans le sol.....</b>	<b>18</b>
<b>II.2. Le silicium chez les plantes.....</b>	<b>18</b>
<b>II.2.1. Mécanismes d'absorption et de transfert du Si .....</b>	<b>19</b>
<b>II.2.1.A. Absorption racinaire de Si .....</b>	<b>20</b>
<b>II.2.1.B. Transferts de Si dans la plante.....</b>	<b>20</b>
<b>II.2.1.C. Caractéristiques fonctionnelles des transporteurs de Si .....</b>	<b>21</b>
<b>II.2.2. Accumulation de Si chez les plantes .....</b>	<b>22</b>
<b>II.2.3. Les effets bénéfiques du Si.....</b>	<b>23</b>
<b>II.2.3.A. Effets bénéfiques du Si chez les plantes soumises à stress biotique .....</b>	<b>23</b>
<b>II.2.4.B. Effets bénéfiques du Si chez les plantes soumises à un stress abiotique .....</b>	<b>23</b>
<b>II.2.4. Mode d'action du Silicium.....</b>	<b>24</b>



II.2.4.A. Mode d'action du Si chez les plantes soumises à un stress biotique.....	24
a. Renforcement de la barrière physique .....	24
b. Stimulation des mécanismes de défense.....	25
II.2.4.B. Mode d'action du Si chez les plantes soumises à un stress nutritionnel .....	25
III. Problématique et objectifs de recherche .....	26
<b>Chapitre II : Matériels et méthodes .....</b>	<b>30</b>
I. Matériel végétal et conditions de culture .....	30
I.1. Culture des plantes en conditions contrôlées (articles 1 et 3) .....	30
I.2. Culture des plantes en conditions de plein champ (cases lysométriques; article 2).....	31
II. Analyses physiologiques, élémentaires et biochimiques .....	32
II.1. Mesure de l'activité photosynthétique et estimation de la teneur en chlorophylles (Articles 1 et 3).....	32
II.1.1. Estimation de la teneur en chlorophylles (Articles 1 et 3) .....	32
II.1.2. Mesure de l'activité photosynthétique (Articles 1 et 3).....	32
II.2. Analyses élémentaires.....	33
II.2.1. Analyse de l'azote total par spectrométrie de masses isotopiques (IRMS) (Articles 1 et 2).....	33
II.2.2. Analyses multi-élémentaires par spectrométrie de masse haute résolution à plasma à couplage inductif (ICP-MS-HR) (Article 2) .....	34
II.2.3. Dosage du Silicium (Si) par colorimétrie (Article 1) .....	35
II.3. Analyses biochimiques .....	36
II.3.1. Détermination des teneurs en peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) (Article 1).....	36
II.3.2. Détermination des teneurs en malondialdéhyde (MDA) (Article 1).....	37
II.3.3. Détermination des teneurs en cytokinines (Article 1).....	37
II.3.4. Détermination des teneurs en huile, en protéines et en glucosinolates des graines par analyses NIRS (Near InfraRed Spectroscopy) .....	38
II.4. Analyses moléculaires .....	38
II.4.1. Extraction des ARN <sub>totaux</sub> et analyses de l'expression des gènes par PCR (Articles 1 et 3).....	38
II.4.2. Analyse différentielle de l'expression des gènes par RNA-Seq (Article 3).....	41
III. Méthodes d'analyses statistiques.....	42
<b>Chapitre III: Résultats .....</b>	<b>43</b>
III.1. Silicon Promotes Growth of <i>Brassica napus</i> L. and Delays Leaf Senescence Induced by Nitrogen Starvation.....	44
III.1.A. Introduction .....	44



III.1.B. Materials and methods.....	46
a. Plant Growth Conditions and Experimental Design .....	46
b. Chlorophyll Contents and Net Photosynthetic Activity of the Mature Leaf.....	47
c. Total Nitrogen and Silicon Analysis.....	48
d. RNA Extraction, Reverse Transcription, Q-PCR and Semi Quantitative PCR Analysis....	48
e. Cytokinin Analysis by UHPLC-MS/MS .....	50
f. Determination of Hydrogen Peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) and Malondialdehyde (MDA) Contents..	51
g. Statistical Analysis .....	52
III.1.C. Results .....	52
a. Plant Growth, Si and N Uptakes and Root Cytokinin Content in <i>Brassica napus</i> Treated With Silicon (Day 0) .....	52
b. Effect of Si Pretreatment on the Evolution of Physiological Indicators of Leaf Senescence.....	53
c. Effect of Si Pretreatment on the Evolution of Molecular Indicators Senescence and Cytokinin, Malondiadehyde and Hydrogen Peroxide Contents in Mature Leaf.....	54
d. N Uptake and N Transporter Gene Expression After the N Resupply Period in N-Deprived Plants Previously Pretreated or Not Treated With Si.....	55
III.1.D. Discussion.....	56
III.1.E. Conclusion.....	59
III.2. Silicon supply promotes agronomic performances of <i>Brassica napus</i> cultivated under filed conditions .....	62
III.2.A. Introduction .....	63
III.2.B. Materials and methods.....	65
a. Site, climatic conditions and lysimeter description.....	65
b. Experimental design .....	65
c. Determination of percentage of green and senescent leaf .....	66
d. Elemental analysis .....	66
e. Determination of oil, protein and glucosinolate concentrations in mature seeds with Near Infrared Spectroscopy (NIRS) .....	67
f. Determination of nitrogen use efficiency indexes .....	67
g. Statistical analysis.....	68
III.2.C. Results .....	68
a. Effect of silicon supply on plant growth and leaf development .....	68
b. Effect of silicon supply on yield and seed quality components .....	69
c. Effect of silicon supply on elemental seed composition .....	69
d. Effect of silicon on nitrogen use efficiency components of plants .....	69
III.2.D. Discussion.....	70



III.1.E. Conclusion.....	72
III.3. Silicon supply broadly affects the root transcriptome of <i>Brassica napus</i> L.....	74
III.3.B. Materials and methods.....	75
a. Seedling growth and Si treatment .....	75
b. Silicon analysis .....	76
c. RNA extraction and RNA sequencing (RNAseq) technology .....	76
d. RNAseq bioinformatic analysis.....	77
e. RNA-Seq data management .....	77
f. Statistical Analysis .....	78
III.3.C. Results and discussion .....	78
III.3.D. Conclusion .....	80
<b><u>Chapitre IV: Discussion générale .....</u></b>	<b><u>81</u></b>
<b><u>Chapitre V: Principales perspectives.....</u></b>	<b><u>88</u></b>
<b><u>Chapitre VI: Références bibliographiques.....</u></b>	<b><u>92</u></b>





# Introduction générale



# Introduction générale

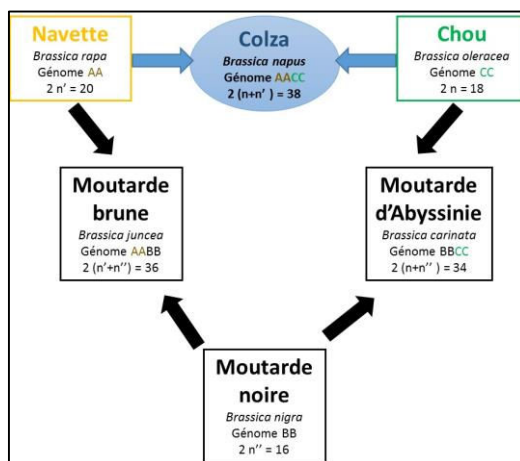


Figure 1: Position du colza dans le triangle de U. A, B et C représentent les différents génomes et n le nombre de chromosomes (d'après Nagaharu, 1935)

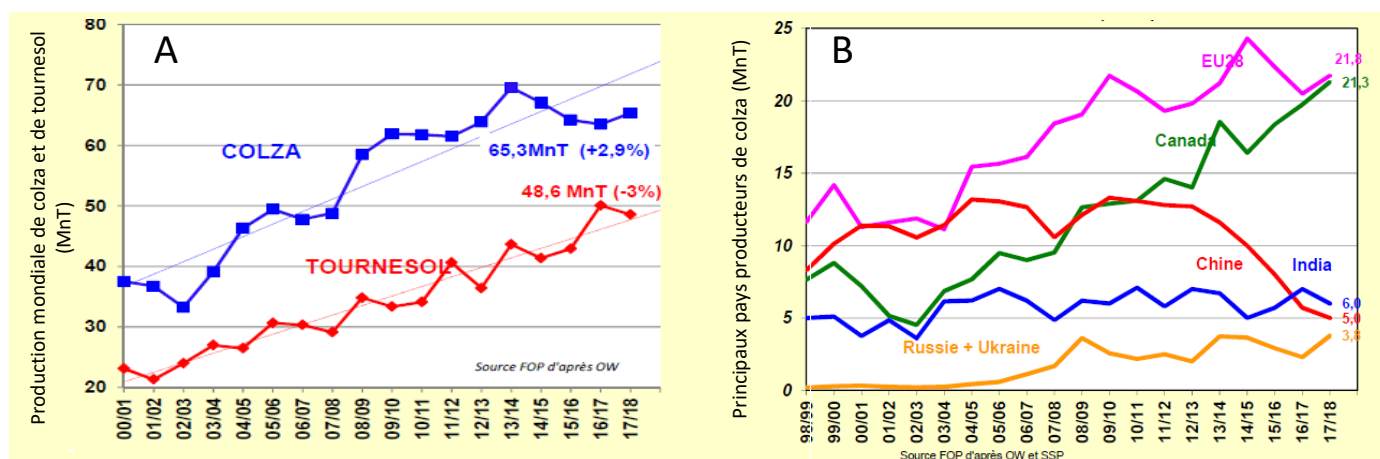


Figure 2: Production mondiale de colza et de tournesol (A) et les principaux pays producteurs de colza (B).

Tableau 1: Surfaces cultivées, production et rendement du colza en France (source FOP).

Colza - France					
	2013	2014	2015	2016	2017
Surfaces (Kha)	1437	1503	1499	1550	1405
Production (KT)	4369	5523	5307	4738	5377
Rdt (Q/Oha)	30,4	36,7	35,4	30,6	38,3

Estimations SSP Dec 2017

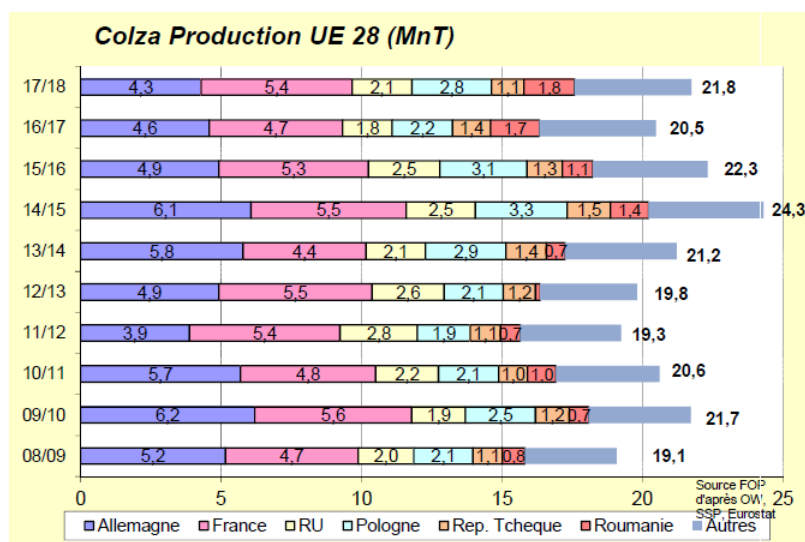


Figure 3: Production de colza des pays de l'Union Européenne

## Introduction générale

Le colza, *Brassica napus* L., appartenant à la famille des Brassicacées, est issu d'un croisement naturel entre le chou (*Brassica oleracea* L.) et la navette (*Brassica campestris* L.; **Figure 1**). Il existe deux variétés de colza : le colza d'hiver cultivé majoritairement en Europe et le colza de printemps qui est plus répandu en Australie et au Canada. Ces deux variétés de colza effectuent respectivement leur cycle de développement en 250-310 jours et 120-150 jours.

Bien que cette plante soit domestiquée depuis plusieurs centaines d'années, sa production mondiale n'a connu un essor que depuis ces 20 dernières années. Ainsi, sa production mondiale de graines a désormais dépassé celle du tournesol (48 MnT) avec une production mondiale d'environ 65 millions de tonnes en 2017 (**Figure 2.A**). En 2017-2018, les premiers producteurs mondiaux de colza sont l'Union européenne avec une production de 21,8 MnT suivie de très près par le Canada avec une production de 21,3 MnT (**Figure 2.B**). En France, malgré la réduction des surfaces ensemencées (réduction de 10% en 2017 par rapport à 2016; **Tableau 1**), l'augmentation des rendements moyens de l'ordre 38 qx/ha (contre 30,6 en 2016) a permis un maintien voire une légère augmentation de la production de graines qui atteignait 5,4 MnT en 2017 (**Figure 3**).

La culture de colza connaît un regain d'intérêt grâce à ses nombreux débouchés agro-alimentaires et industriels (**Figure 4**). En effet, après trituration des graines, l'huile brute obtenue peut être directement utilisée pour l'alimentation humaine et le résidu issu de l'extraction d'huile (tourteau) peut être utilisé pour l'alimentation animale. L'huile de colza peut également subir plusieurs processus de raffinage consécutifs permettant d'obtenir soit l'huile semi raffinée utilisée dans le domaine non alimentaire comme la chimie verte (production de lubrifiants, détergents et de produits cosmétiques) soit la production de biocarburants (**Figure 4**; [www.terresinovia.fr](http://www.terresinovia.fr)).

Pour chacune de ces utilisations, les graines de colza sont sectionnées en fonction de leur composition en acides gras (**Tableau 2**). A titre d'exemple, les graines des variétés utilisées pour l'alimentation humaine contiennent 40 à 50% d'huile, composée en moyenne de 22% d'acide linoléique (précurseur d'oméga 6; **Figure 4**) et 9% d'acide linoléique (précurseur

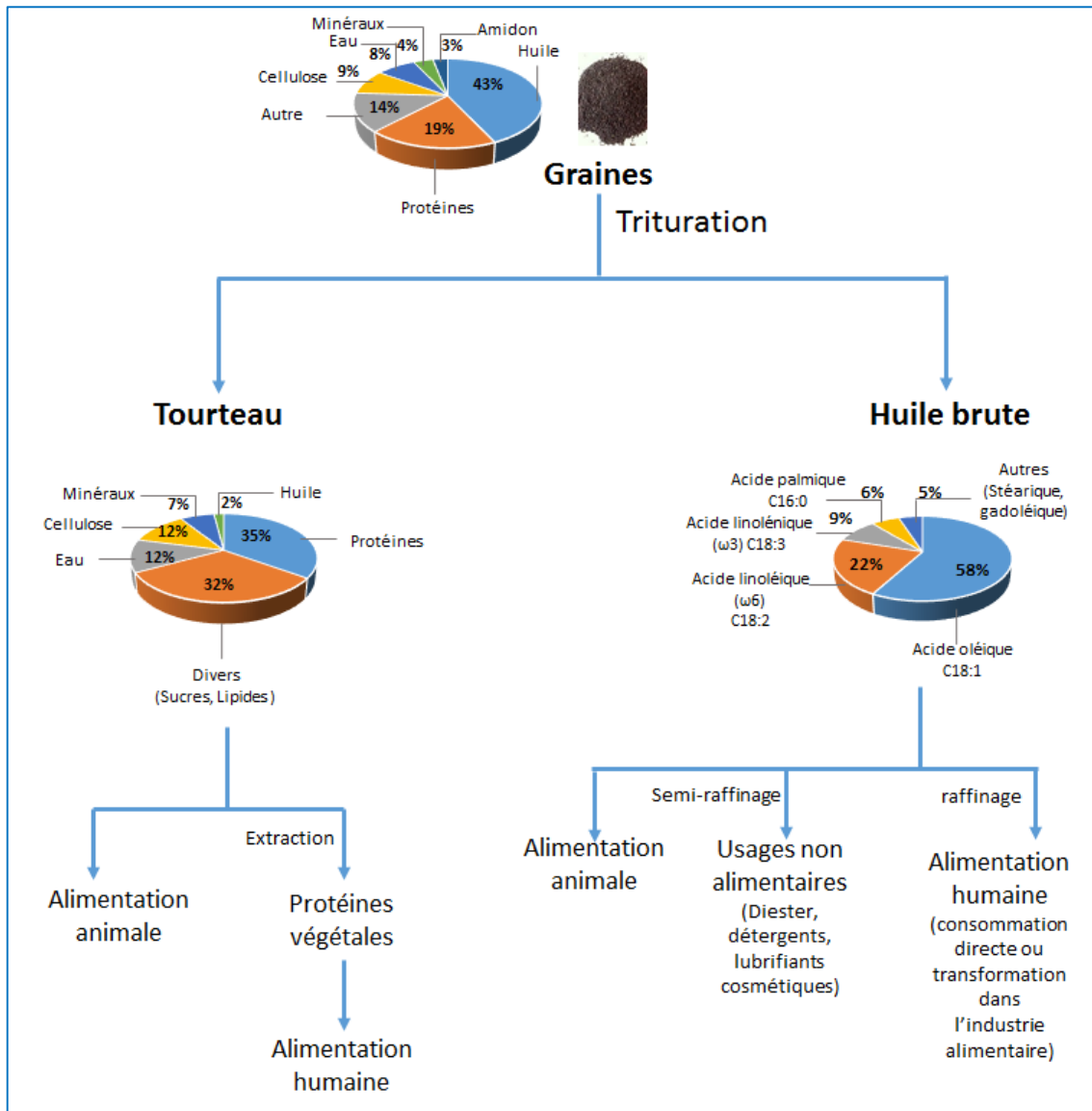


Figure 4: Compositions des graines de colza et leurs utilisations dans l'industrie alimentaire et non alimentaire. (Sources: terresoleopro, terresinovia, Nési et al., 2008)

Tableau 2: Différentes utilisations de l'huile de colza en fonction de la composition en acides gras de l'huile extraite des graines.

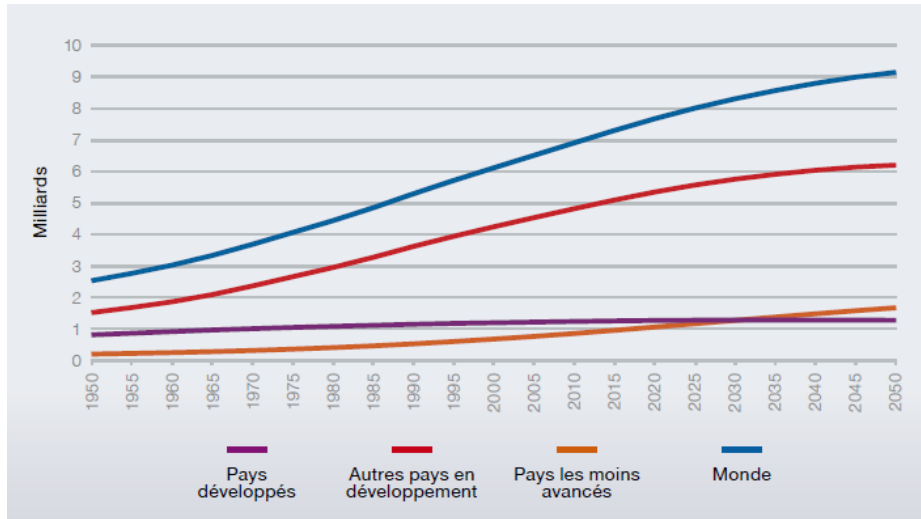
Riche en acide érucique	Riche en acide oléique	Faible en acide α-linoléique et riche en acide oléique	Riche en acide α-linoléique
Chimie verte: Détergent Lubrifiant Produits cosmétiques	Chimie verte Diététique Biocarburant	Alimentation: Friture	Diététique Biocarburant

d'oméga 3; **Nési et al., 2008**). Par ailleurs, l'huile de colza utilisée dans l'alimentation humaine contenait naturellement de l'acide érucique, molécule supposée toxique pour l'homme. Par conséquent, une première sélection génétique a été réalisée afin de produire des variétés de colza, appelées variété zéro « 0 » présentant une faible teneur en acide érucique, particulièrement bénéfique pour la santé humaine (**Cho et al., 2010; Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail**). Le colza est également intéressant pour son tourteau (résidu de trituration de l'huile) riche en protéines et en acides aminés essentiels (*i.e.* non synthétisés par les animaux) tels que la méthionine, la thréonine ou la lysine et en minéraux comme le calcium et le phosphore (**Papas et al., 1979; Solomon et al., 1991; Terresinovia**). Toutefois, ce tourteau, utilisé dans l'alimentation animale, présentait une appétence inversement proportionnelle à sa teneur en glucosinolates (hétérosides soufrés). Ainsi, afin d'améliorer sa qualité, des variétés «0 glucosinolate» avec des teneurs faibles en glucosinolates (<20  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de matière sèche délipidée) ont aussi été sélectionnées. Cette double sélection du colza a donc conduit à la mise sur le marché de variétés de colza dites « 00 » qui présentent à la fois de faibles teneurs en acide érucique et en glucosinolates dans les graines.

Depuis plusieurs décennies, l'agriculture s'est orientée vers des productions intensives pour répondre à l'augmentation de la demande alimentaire mondiale qui ne cesse de croître (**Figure 5**). Toutefois, cette mutation agricole s'est effectuée au détriment de l'environnement puisque cette intensification s'est accompagnée d'une augmentation des apports d'intrants (et notamment azotés) afin d'obtenir de forts rendements. En effet, depuis une quarantaine d'années, si les apports d'intrants azotés et phosphatés ont permis un doublement des rendements des principales espèces de grande culture (**Tilman et al., 2002**), ils ont aussi profondément impacté l'environnement. A titre d'exemple, l'utilisation massive d'engrais azotés a engendré des pollutions environnementales liées aux pertes d'azote par lessivage du nitrate vers les cours d'eau et les nappes phréatiques ou au rejet, vers l'atmosphère, de gaz à effet de serre tels que le protoxyde d'azote (**Lassaletta et al., 2014**).

Actuellement, les objectifs agronomiques visent à maintenir, voire à améliorer, les rendements des plantes de grande culture telles que le colza tout en réduisant les apports d'intrants (notamment azotés) afin d'améliorer le bilan agro-environnemental des cultures.





**Figure 5: Evolution mondiale de la population entre 1950 et 2015 et prédictions jusqu'en 2050 (Source FAO).**

Dans ce contexte, la sélection et l'amélioration variétales sont à l'origine de projets de recherche d'envergure visant à obtenir des variétés à efficacité d'usage de l'azote (EUA) optimisée. Toutefois, d'autres alternatives et notamment celles consistant à utiliser les propriétés biostimulantes de substances naturelles pour améliorer l'absorption, l'assimilation et/ou la remobilisation de l'azote constitue une piste de recherche particulièrement intéressante. Ainsi, si les propriétés biostimulantes des extraits d'algues et d'acides humiques chez le colza sont étudiées depuis de nombreuses années (**Jannin et al., 2012; 2013; Billard et al., 2014**), les effets d'autres molécules biologiques beaucoup plus simples (telles que le silicium (Si)) et à propriétés biostimulantes potentielles, restent à ce jour très peu étudiés.

Dans la bibliographie, le Si est défini comme étant un élément non essentiel mais bénéfique pour les plantes notamment lorsque celles-ci sont soumises à des stress biotiques et abiotiques. Par exemple, plusieurs études montrent l'effet bénéfique du Si lorsque les plantes sont soumises aux basses températures, à une période de sécheresse ou un stress salin (**Ma et al., 2001; Ma, 2004; Ma et al., 2004 Gong et al., 2006; Mahdieh et al., 2015**). Des effets bénéfiques du Si sont aussi observés chez les plantes cultivées dans des conditions de carence en phosphate ou en potassium (**Yamaji et al., 2012. Chen et al., 2016**).

Compte-tenu des nombreux effets bénéfiques du Si, l'objectif de ce travail de thèse est de tester ses effets sur une culture de colza menée en condition de stress azoté, en se focalisant principalement sur la sénescence foliaire, la nutrition azotée mais également sur les performances agronomiques du colza cultivé en condition de plein champ.

Ce mémoire de thèse débutera par une «Synthèse bibliographique » (Chapitre I) résumant la place du colza dans la filière des oléoprotéagineux, les modifications biochimiques et moléculaires associées à la sénescence foliaire et également une partie faisant l'état de l'art des connaissances sur le silicium, ses différents effets bénéfiques et son mode d'action dans l'atténuation des différents stress chez les végétaux. Les principaux dispositifs expérimentaux et méthodes d'analyses utilisés pour répondre aux objectifs de ce travail de recherche sont décrits dans la section « Matériels et Méthodes » (Chapitre II). Les résultats sont ensuite présentés sous forme de trois articles (Chapitre III). Ce manuscrit de thèse s'achèvera par une partie « Discussion générale » (Chapitre IV) qui sera suivie de la présentation des principales perspectives découlant de ce travail de recherche (Chapitre V).



Ce projet thèse a été cofinancé par l'Union Européenne *via* le Conseil Régional de Normandie, dans le cadre du programme opérationnel FEDER-FSE 2014-2020 et par le Centre Mondial de l'Innovation (CMI) du groupe Roullier.



# Chapitre I :

## Synthèse bibliographique



# Chapitre I :

## Synthèse bibliographique



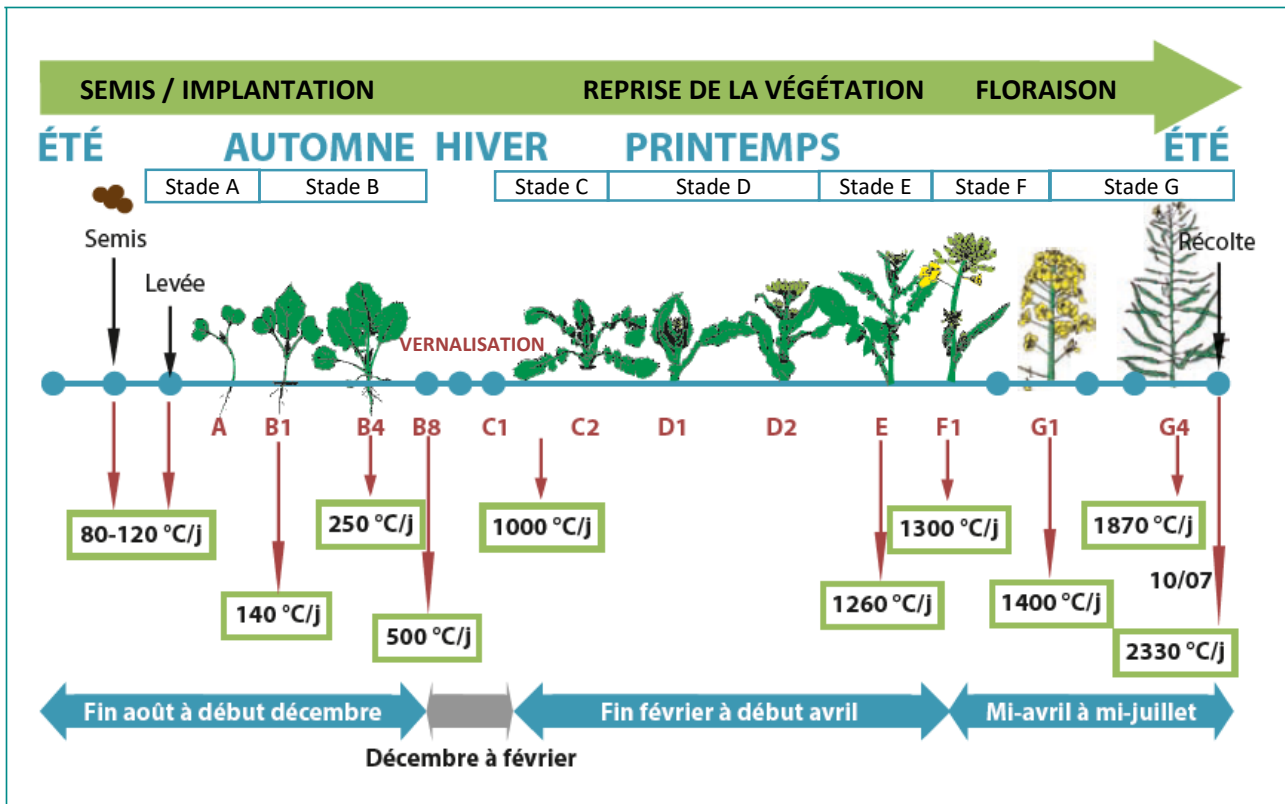


Figure I.1: Cycle de développement du colza d’hiver, du semis à la formation des graines (source Terresinova; Hebing, 2013)

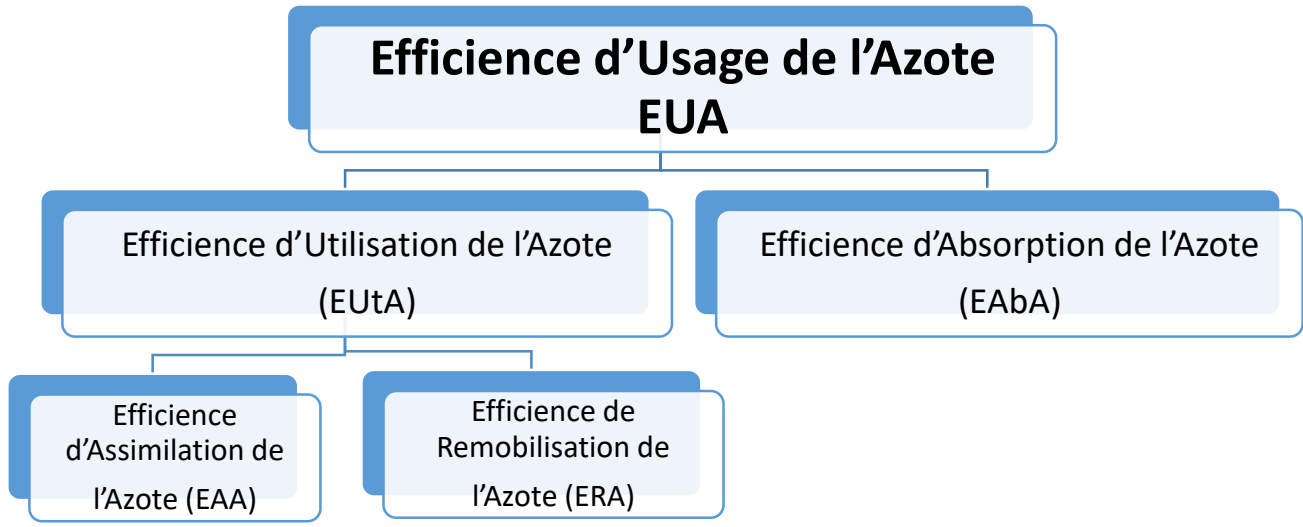


Figure I.2: Différentes composantes de l’Efficacité d’Usage de l’Azote (EUA) (d’après Masclaux-Daubresse et al., 2010).

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

### I. Généralité sur le colza

#### **I.1. Cycle de développement**

Le colza est la plante annuelle présentant le cycle de développement le plus long parmi l'ensemble des plantes annuelles cultivées en France et en Europe. Celui-ci est composé de deux phases : la première correspond à une phase de croissance végétative, durant laquelle le colza produit de nouvelles feuilles pétiolées et sans entrenœud entre les rangs foliaires. Cette phase s'étend du stade cotylédonaire (stade A) jusqu'au stade de la formation de la rosette (stade B; **Figure I.1**). La seconde phase, appelée phase reproductrice, est initiée lors de la montaison (Stade C) et s'étend jusqu'à la maturation des graines (stade G; **Figure I.1**). Contrairement au colza de printemps, chez le colza d'hiver, la montaison et l'initiation florale nécessitent une période de vernalisation.

#### **I.2. La nutrition azotée**

Qualifié de « pompe à nitrate », le colza présente de fortes capacités d'absorption du nitrate (**Lainé et al., 1993**). Son implantation pendant les périodes inter-culturelles permet de limiter le lessivage du nitrate issu de la minéralisation de la matière organique pendant la période automno-hivernale. Sa culture nécessite néanmoins des apports azotés importants au cours de son cycle de développement (de l'ordre de 160 à 250 kg N ha<sup>-1</sup>, **Rathke et al., 2005**). En effet, malgré sa forte capacité à prélever l'azote minéral, le colza se caractérise par une faible Efficacité d'Usage de l'Azote (EUA; **Figure I.2**) définie comme le rendement en graines obtenu par unité d'azote disponible dans le sol (**Masclaux-Daubresse et al., 2010**).

L'EUA est constituée de 2 composantes: l'Efficacité d'Absorption de l'Azote (EAbA) et l'Efficacité d'Utilisation de l'Azote (EUtA) (**Figure I.2; Kant et al., 2010; Masclaux-Daubresse et al., 2010; Xu et al., 2012**).

##### a. l'Efficacité d'Absorption de l'Azote (EAbA) :

Cette sous-composante est définie comme la capacité des racines à absorber l'azote du sol. Les différentes formes d'azote du sol prélevées par les plantes sont principalement le nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) et l'ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), le nitrate constituant la forme préférentiellement absorbée par le colza. Leur disponibilité est fonction de la minéralisation de la matière

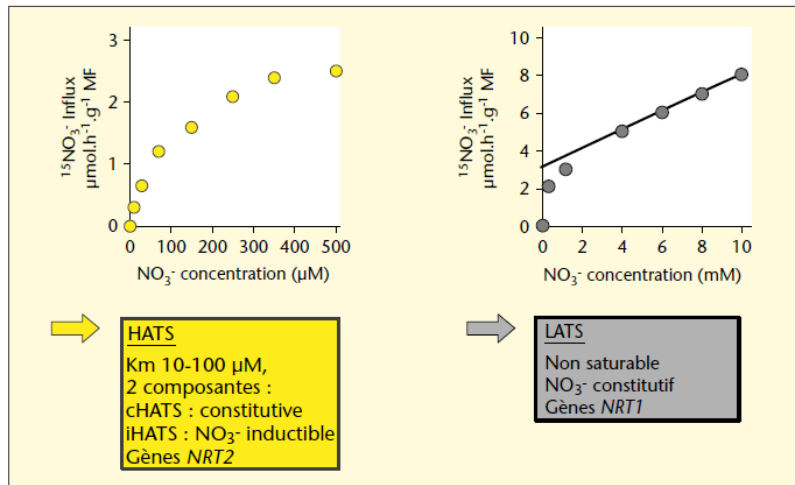


Figure 1.3: Evolution de l'Influx de nitrate transmembranaire en fonction de la concentration externe en nitrate par le système de transport forte (HATS; graphique de gauche) et faible affinité (LATS; graphique de droite) (d'après Morot-Gaudry et *al.*, 2006).

organique par les microorganismes du sol et des niveaux d'intrants apportés. L'absorption de ces différentes formes est assurée par des transporteurs racinaires spécifiques. Ainsi, des études centrées sur l'absorption racinaire du  $\text{NO}_3^-$  et du  $\text{NH}_4^+$  ont montré que les plantes présentent deux systèmes de transport afin de faire face aux disponibilités fluctuantes de celles-ci dans le sol (Crawford et Forde, 2002; Wang et al., 2009) :

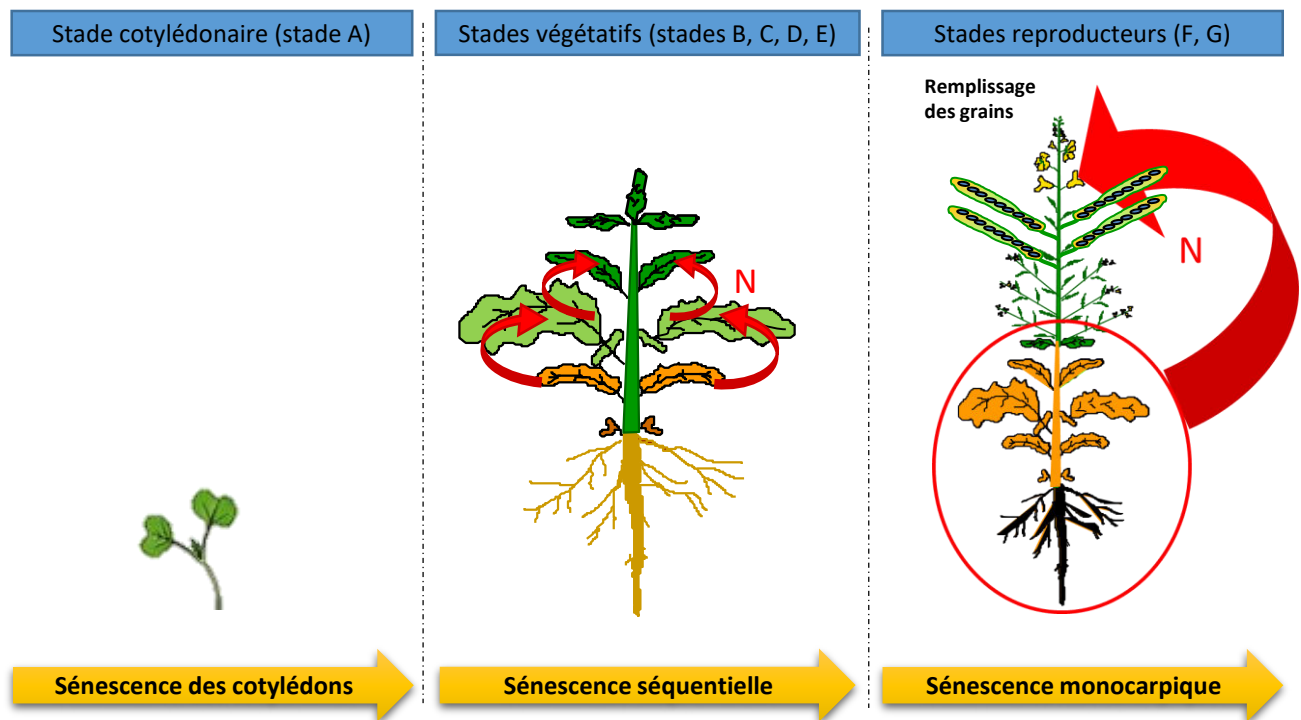
- un système de transport à haute affinité (HATS) saturable par son substrat et qui permet aux plantes d'absorber les différentes formes d'azote lorsqu'elles sont présentes à faibles concentrations (<1 mM) dans le sol (Figure I.3). Ce système est constitué par deux composantes : l'une constitutive (cHATS) et l'autre inducible (iHATS) par son substrat. Les différents gènes codant les systèmes de transport HATS du nitrate et de l'ammonium sont respectivement appelés *NRT2* et *AMT2*.
- un système de transport à faible affinité (LATS) non saturable et qui fait intervenir des transporteurs permettant l'absorption des différentes formes d'azote lorsqu'elles sont présentes à fortes concentrations (> 1 mM; Figure I.3). Les différents gènes codant le système de transport du nitrate et de l'ammonium sont respectivement appelés *NRT1* et *AMT1*.

b. L'Efficiences d'Utilisation de l'Azote (EUtA) :

EUtA est elle-même constituée de 2 sous-composantes (Figure I.2) :

- L'Efficiences d'Assimilation de l'Azote (EAA) définie comme le taux d'assimilation de l'azote en condition limitante par rapport à une condition non limitante en azote.
- L'Efficiences de Remobilisation de l'Azote (ERA) représentant le pourcentage d'azote remobilisé depuis les feuilles sénescentes (organes sources) vers les organes puits (feuilles en croissance ou les graines).

Le colza présente une forte capacité à absorber (EAbA) et à assimiler (EAA) le nitrate notamment grâce à des enzymes foliaires (nitrate et nitrite réductase, glutamine synthase, glutamate déshydrogénase et glutamine oxoglutarate amino-transferase) particulièrement efficaces. Il est caractérisé par une faible efficacité d'utilisation de l'azote (EUtA). Ainsi, des études montrent que cette faible EUtA serait principalement due à une mauvaise Efficience de Remobilisation de l'Azote (ERA) foliaire notamment lors de la sénescence séquentielle qui



**Figure I.4: Les différents types de sénescence foliaire se manifestant au cours du cycle de développement du colza.** Durant le stade végétatif, la sénescence est qualifiée de séquentielle, car elle affecte graduellement les feuilles le long de l'axe de la plante. L'azote est remobilisé des vieilles feuilles sénescentes (organes sources) vers les feuilles en croissance (organes puits). Au stade reproducteur, la sénescence est dite monocarpique, puisqu'elle se généralise à l'ensemble des organes de la plante et l'azote est remobilisé des tissus végétatifs vers les organes reproducteurs (d'après Desclos, 2008).

a lieu durant la phase végétative du cycle de développement du colza (**Malagoli et al., 2005a, b; Girondé et al., 2015**).

### **I.3. Sénescence foliaire et remobilisation de l'azote**

#### **I.3.A. Définition de la sénescence :**

La sénescence foliaire est un processus naturel, défini comme l'ensemble des modifications physiologiques, biochimiques et moléculaires au sein des cellules d'un organe (feuille par exemple) et conduisant à sa mort (**Leopold, 1975**). Ce processus génétiquement contrôlé participe à la mobilisation et à l'exportation des nutriments (tel que l'azote, le phosphore et le soufre) des organes sources (comme les feuilles âgées) vers les organes puits tels que les méristèmes, les bourgeons, les feuilles en croissance, les fruits et les organes de stockage (**Qin et al., 2006; Gregersen, 2011**).

#### **I.3.B. Les différents types de sénescence**

Outre la sénescence des cotylédons, il est possible de distinguer deux types de sénescence ayant lieu à des stades de développement différents du colza (**Figure I.4; Desclos, 2008**):

##### **a. La sénescence séquentielle**

Cette sénescence a lieu au stade végétatif du développement de la plante (Stade B/C; Stade reprise de végétation) et s'étend jusqu'au stade floraison (Stade F). Elle est caractérisée par une progression acropète le long de l'axe de la plante au fur et à mesure que les feuilles atteignent leur maturité (**Marouf et Reynaud, 2007**). Une partie de l'azote issu des feuilles basales sénescentes est alors mobilisée au profit des jeunes feuilles en croissance.

##### **b. La sénescence monocarpique**

Cette sénescence a lieu au stade G1 (stade de formation des graines). Elle s'étend à l'ensemble des organes de la plante (feuilles, pivot, tige). Elle est caractérisée par une forte remobilisation d'azote associée à la mort de l'appareil végétatif durant une période du cycle de développement où l'absorption racinaire de l'azote est fortement réduite. Ainsi, l'azote endogène remobilisé au cours de ce processus de sénescence généralisée devient la source d'azote principale pour assurer le remplissage en N des grains (**Rossato et al., 2001**).



### I.3.C. Modifications physiologiques, biochimiques et moléculaires associées à la sénescence

Il est clairement admis que le phénomène de sénescence est très complexe et met en jeu de nombreuses modifications géniques et métaboliques régulées par de nombreux facteurs endogènes et/ou environnementaux.

À l'échelle de l'organe, la sénescence se traduit par un jaunissement des organes photosynthétiques (principalement les feuilles) associé à la dégradation des chlorophylles et à l'accumulation d'autres pigments tels que les anthocyanes et les caroténoïdes. Au niveau de la feuille, la sénescence progresse de la base vers l'extrémité apicale du limbe et s'achève par l'abscission (**Watanabe et al., 2013**). Les tissus autour du système vasculaire sont les derniers à entrer en sénescence, ce qui permet le transport des molécules issues du catabolisme jusqu'à des stades avancés de la sénescence (**Gan et Amasino, 1997**).

À l'échelle cellulaire, la sénescence se divise en trois phases durant lesquelles se produiront de nombreuses modifications métaboliques (**Zimmermann et Zentgraf, 2005; Sorin, 2014**) : une phase d'initiation suivie d'une phase de réorganisation puis d'une phase terminale qui conduit à la mort de la cellule (**Figure I.5**).

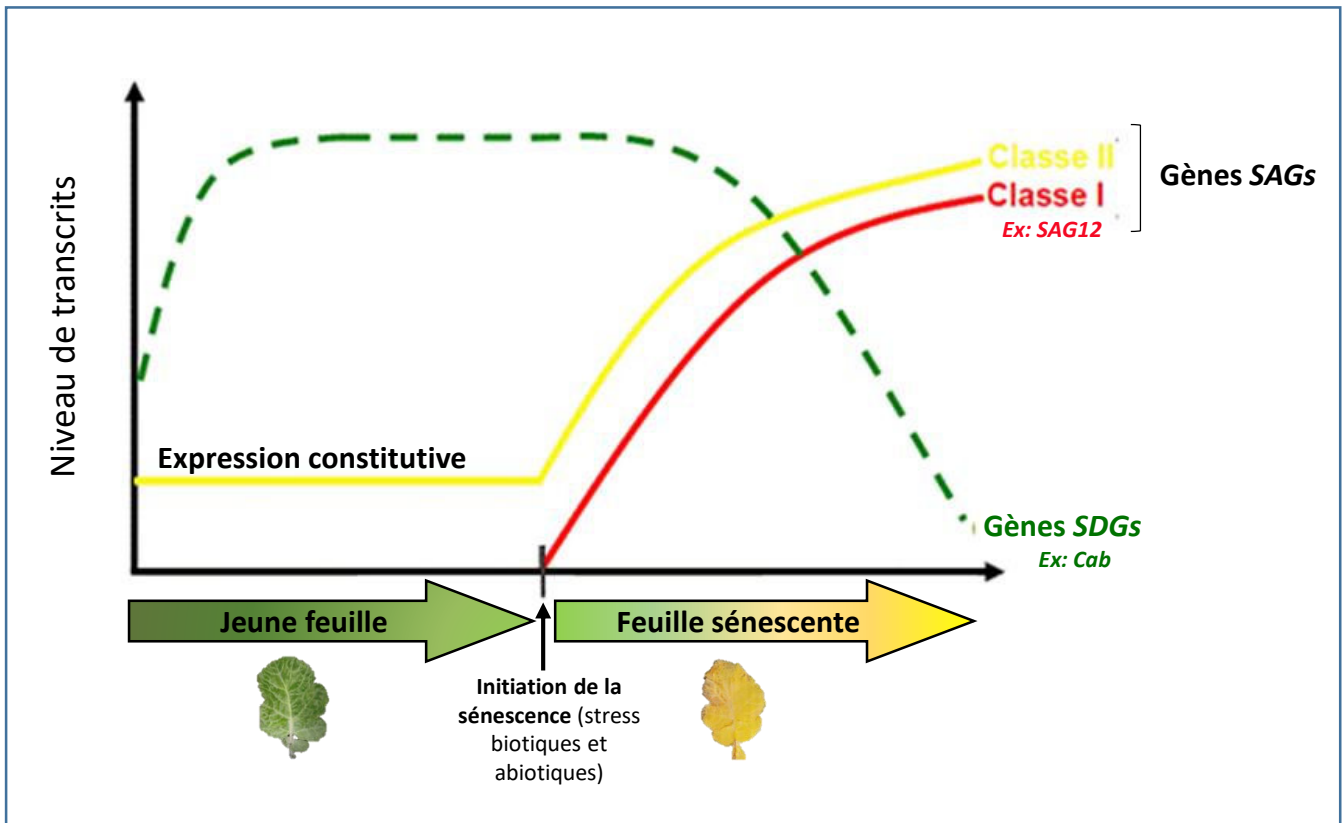
#### I.3.C.1. La phase d'initiation de la sénescence

La sénescence est un processus finement programmé dont l'initiation est sous la dépendance de facteurs endogènes ou exogènes. Parmi les facteurs endogènes, peuvent être cités le stade de développement de la plante et l'âge de l'organe qui font intervenir des modifications hormonales (notamment une chute des teneurs en cytokinines foliaires; **Smart et al., 1991**). Les facteurs exogènes peuvent être d'ordre biotiques (attaques de pathogènes par exemple; **Morot-Gaudry et al., 2017**), ou abiotiques tels que l'ombrage et les privations en certains nutriments (comme l'azote, **Wingler et al., 2005; Slimane, 2010**). Les différents facteurs induisant la sénescence sont explicités plus en détail dans le chapitre I § I.3.D.

#### I.3.C.2. La phase de réorganisation de la sénescence

C'est au cours de cette phase que survient le catabolisme des macromolécules et la dégradation/réorganisation de certains organites cellulaires. Les chloroplastes sont les premiers organites touchés par la sénescence (**Hörtensteiner et Kräutler, 2011**), leur dégradation participant au jaunissement des feuilles, premier symptôme visuel de la



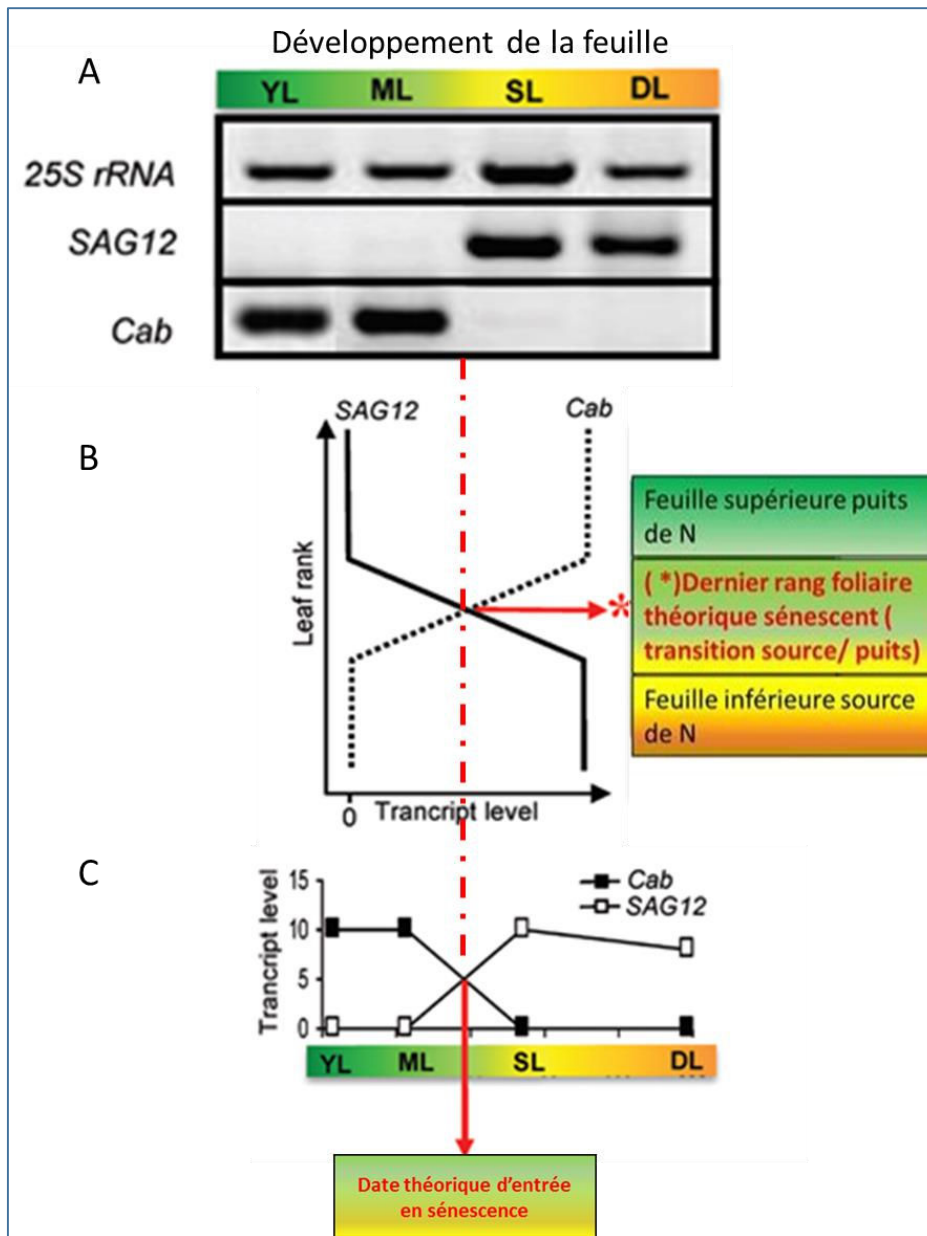


**Figure I.6: Expression des gènes *SDGs* et *SAGs* durant le développement de la feuille. *SDGs*: Senescence Down-regulated Genes, *SAGs*: Senescence Associated Genes. Les gènes *SAGs* sont composés de deux classes (Classe I et Classe II) (d'après Gan et Amasino, 1997; Zimmerman et Zentgraf, 2005).**

sénescence. Durant cette phase, les chloroplastes évoluent en gérontoplastes, plastes présentant un nombre restreint de thylakoïdes et une accumulation de plastoglobules (**Biswal et al., 2012; Golczyk et al., 2014**). Les protéines plastidiales qui peuvent représenter plus de 70% des protéines foliaires sont majoritairement dégradées, fournissant ainsi une quantité importante d'azote à remobiliser sous forme d'acides aminés et de peptides (**People et Dalling, 1988; Gan et Amasino, 1997**). Parmi ces protéines, la Rubisco (Ribulose 1,5-biphosphate carboxylase-oxygenase) et les protéines membranaires impliquées dans les photosystèmes (Light Harvesting complexes (LHCI/II)) (**Hörtensteiner et Feller, 2002; Kumar et al., 2002**) sont des cibles privilégiées dont la dégradation conduit à une diminution de l'activité photosynthétique (**Stressman et al., 2002; Biswal et al., 2012, Wu et al., 2012**). Par conséquent, l'énergie lumineuse n'étant plus utilisée pour la photosynthèse, elle conduit à une production de ROS (« Reactive Oxygen Species » : dérivés réactifs de l'oxygène) à l'origine d'un stress oxydatif (**Lu et al., 2003**). Par ailleurs, la diminution de l'activité photosynthétique conduit à une chute de la synthèse de glucose à un moment où les besoins énergétiques sont particulièrement importants notamment pour assurer les différentes activités cataboliques.

Afin de faire face à cette situation, les peroxysomes vont évoluer en glyoxysomes et l'activation des enzymes de la voie du glyoxylate vont permettre la synthèse de glucides à partir d'acétyl-coenzyme A. Ces glucides vont approvisionner le métabolisme mitochondrial et ainsi assurer la synthèse d'énergie (ATP) essentielle au bon fonctionnement des enzymes impliquées dans les réactions cataboliques associées à la sénescence (**Hayashi et al., 2000**).

C'est également pendant cette phase que de profondes modifications de l'expression des gènes sont initiées. En effet, les techniques de criblage différentiel et d'hybridation soustractive de banques d'ADNc ont révélé que de nombreux gènes sont réprimés ou induits pendant la sénescence (**Guo et Gan, 2005**). Les gènes dont l'expression est réprimée sont appelés *SDGs* (pour Senescence Down-regulated Genes; **Figure I.6**). Ces gènes codent majoritairement des protéines associées à la photosynthèse telles que les protéines de liaison aux chlorophylles a/b (Cab : chlorophyll a/b binding proteins) (**Hensel et al., 1993; Hinderhofer et Zentgraf, 2001; Zimmermann et Zentgraf, 2005**).



**Figure I.7: Expression des gènes *SAG12* et *Cab*, utilisés comme indicateur moléculaire de la progression spatio-temporelle de la sénescence foliaire chez le colza (*Brassica napus* L.). (A) Accumulation des transcrits de gènes *SAG12/Cab* révélant la progression temporelle de la sénescence des feuilles. (B) Représentation schématique de l'expression des transcrits des gènes *SAG12* et *Cab* en fonction du rang foliaire. Sur l'axe de la plante, le dernier rang foliaire théorique sénescent est matérialisé par le point d'intersection correspondant à une diminution d'expression du gène *Cab* concomitante avec l'augmentation d'expression du gène *SAG12*. (C) Expression des gènes *SAG12* et *Cab* pour un rang foliaire donné, et date théorique d'entrée en sénescence déterminée par le point d'intersection résultant de la répression de l'expression des gènes *Cab* et l'induction de l'expression des gènes *SAG12*. Les différentes étapes du développement de la feuille correspondent à: Jeune feuille (YL), feuille mature (ML), feuille sénescente (SL) et feuille morte (DL) (d'après Gombert et al., 2006; Avice et Etienne, 2014).**

Les gènes induits durant la sénescence sont appelés SAGs (pour Senescence-Associated Genes; **Figure I.6**). Ils peuvent être classés en deux groupes (**Hensel et al., 1993; Lohman et al., 1994**):

- Les SAG de classe I spécifiquement induits lorsque l'organe entre en sénescence,
- Les SAG de classe II présentant une faible expression, constitutive du développement de la plante et dont le niveau d'expression est fortement augmenté lors de la sénescence (**Gan et Amasino, 1997**).

Les gènes SAGs codent des protéines impliquées dans la dégradation des composés cellulaires, la remobilisation et le transport de nutriments ou encore des protéines de défense et de réponse aux stress (**Wu et al., 2012**). Un exemple de SAG de classe I est le gène *SAG12*, qui code une protéase à cystéine très fortement exprimée lors de sénescence (**Gan, 1995; Buchanan-Wollaston et al., 2003**). Du fait que le gène *SAG12* soit exprimé exclusivement pendant la sénescence, il peut être utilisé comme un marqueur moléculaire de la sénescence foliaire du colza (**Figure I.7**). Ainsi, chez le colza, il est possible de suivre la progression spatio-temporelle de la sénescence séquentielle des feuilles en suivant l'expression concomitante des gènes *Cab* et *SAG12* (**Gombert et al., 2006**). A titre d'exemple, il est possible d'estimer la date théorique d'entrée en sénescence d'une feuille en suivant la cinétique d'expression des gènes *SAG12* et *Cab* (**Figure I.7; Gombert et al., 2006; Avice et Etienne, 2014**).

Plusieurs études montrent que l'expression des gènes SAGs est sous la dépendance de facteurs de transcription spécifiques. Par exemple, une surexpression de WRKY53 entraîne une induction de l'expression de *SAG12* chez *Arabidopsis thaliana* (**Miao et al., 2004**). D'autres travaux réalisés chez le blé (*Triticum aestivum*) suggèrent que les facteurs de transcription NAC seraient fortement impliqués dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes SAGs lors de la sénescence foliaire (**Christiansen et Gregersen, 2014**).

### I.3.C.3. Phase terminale de la sénescence

Durant cette phase terminale, il se produit une dégradation des organites restés intacts tout au long du processus de sénescence tels que les mitochondries et le noyau (**Figure I.5; Lim et al., 2007**). Ainsi, les mitochondries, organites essentiels pour assurer la production d'ATP nécessaire à la bonne progression de la sénescence, sont préservés jusqu'à cette phase terminale (**Quirino et al., 2000; Del Rio et al., 2003**). De même, le noyau nécessaire pour la



transcription des gènes associés à la sénescence, est maintenu intact jusqu'au stade ultime de la sénescence (**Gan et Amasino, 1997; Guo et Gan, 2005; Lim et al., 2007**). Enfin, à la fin de cette phase, les vacuoles, les acides nucléiques et les membranes restantes (membranes des mitochondries, du noyau, de la vacuole et des chloroplastes) sont à leur tour dégradés. Ces événements sont associés à une forte accumulation de formes actives d'oxygène dans la cellule qui participeront à la mort cellulaire programmée (PCD « Programmed Cell Death ») de l'organe (**Lim et al., 2007; Shahri, 2011**). Cette phase terminale, contrairement aux phases d'initiation et de réorganisation, est irréversible. Elle correspond au stade ultime de la sénescence et conduit inéluctablement à la mort de l'organe (**Zemmerman et Zentgraf, 2005**).

### **I.3.D. Régulation de la sénescence séquentielle**

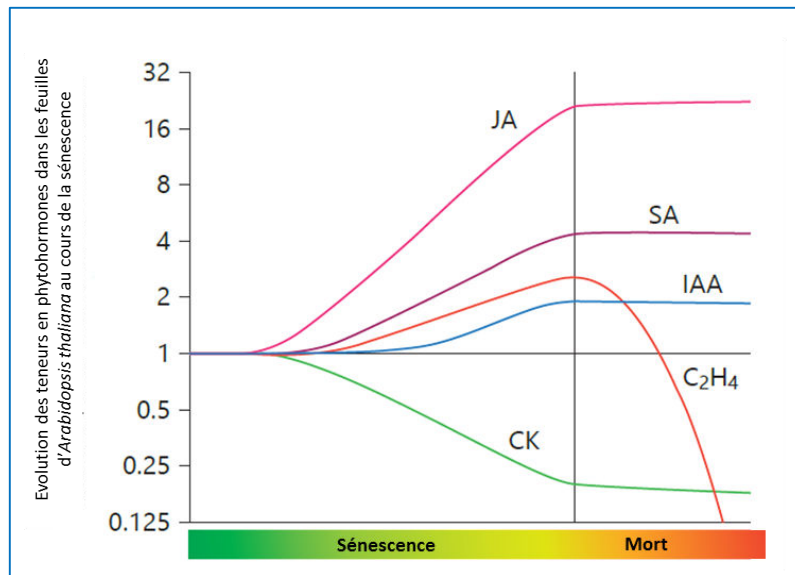
Des approches physiologiques, biochimiques et moléculaires sont menées depuis plusieurs décennies afin de mieux appréhender les facteurs endogènes et exogènes impliqués dans la régulation de ce processus.

#### **1. Facteurs endogènes**

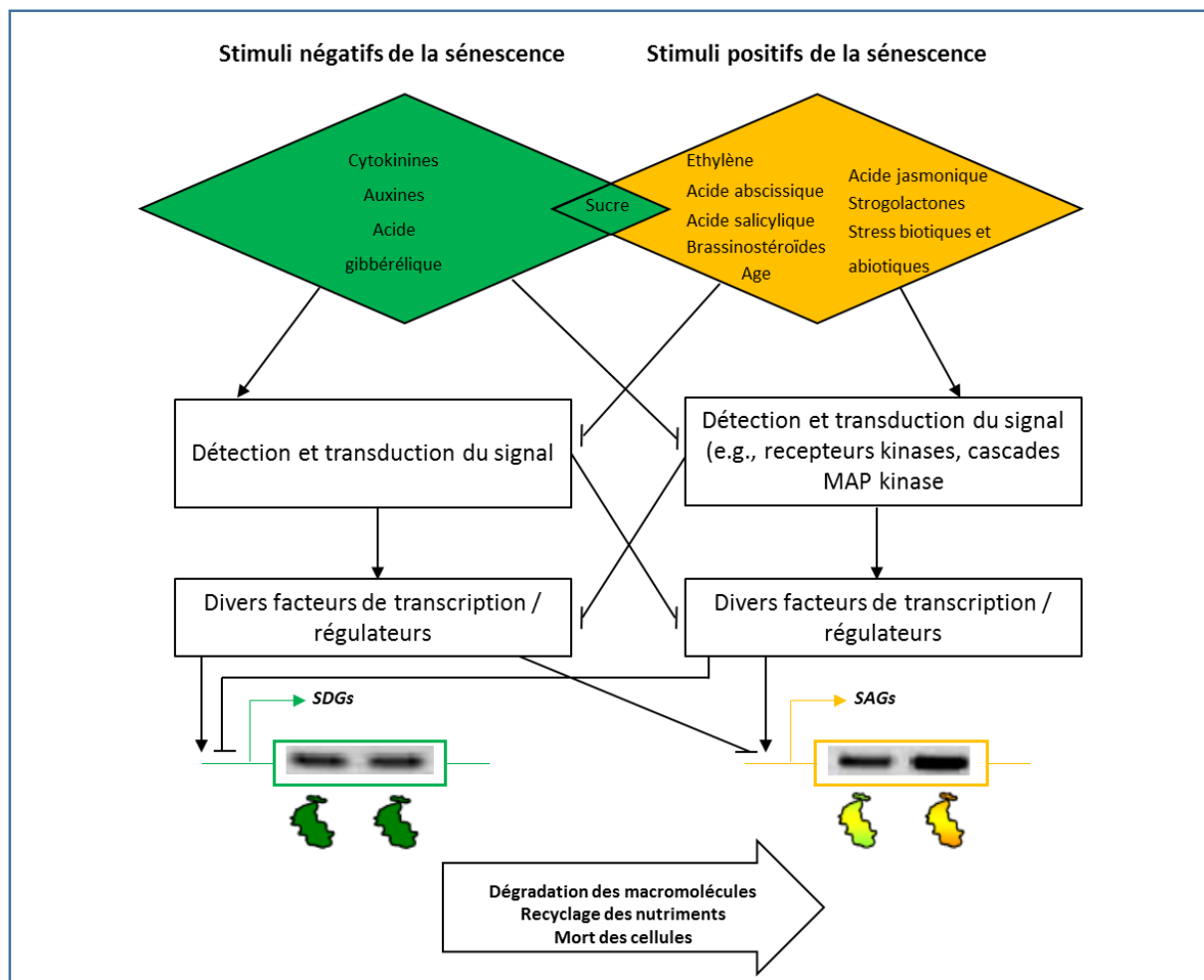
Les facteurs endogènes déclenchant la sénescence interviennent lors du vieillissement de la feuille. En effet, dès que la feuille atteint sa maturité, elle entre en sénescence afin de permettre l'exportation des nutriments vers les organes en croissance (**Guo et Gan, 2005**). L'accumulation des ROS et la diminution de l'activité photosynthétique sont aussi des facteurs qui induisent la sénescence des feuilles, mais il est difficile de déterminer avec précision si ces facteurs sont la cause ou la conséquence de l'induction de la sénescence (**Guo et Gan, 2005**). D'autres facteurs endogènes comme les glucides (et plus précisément, une augmentation du rapport C:N), les phytohormones et l'expression de facteurs de transcription sont également connus pour participer à la régulation de ce processus.

##### **a. Les glucides et rapport C:N**

Chez différentes espèces telles que la tabac (**Wingler et al., 1998**) et la tomate (**Dai et al., 1999**), plusieurs études ont montré que des niveaux élevés en glucides peuvent induire la sénescence des feuilles matures (**Weaver et Amasino, 2001; Parrott et al., 2005; Wingler et al., 2009**). En effet, leur accumulation dans les feuilles provoque une diminution de la photosynthèse et ainsi, une induction de la sénescence foliaire (**Quirino et al., 2000; Rolland et al., 2002**). Ce signal « glucides » serait associé au rétrocontrôle négatif des glucides sur



**Figure I.8: Changement de la production de l'éthylène et les niveaux d'acide jasmonique (JA), d'acide salicylique (SA), d'auxines (IAA) et de cytokinines (CK) au niveau des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* au cours de la sénescence.** Les résultats ont été exprimés par rapport aux feuilles témoins non sénescentes et dont les valeurs sont rapportées à 1 (d'après Khan et al., 2013).



**Figure I.9: Représentation schématique de la régularisation de la sénescence foliaire.** Les stimuli positifs déclenchent la sénescence des feuilles en induisant l'expression des facteurs de transcription et l'expression des gènes SAGs (Senescence Associated Genes) après transduction du signal et cascade de signalisation. Les stimuli négatifs quant à eux, répriment l'expression des gènes SAGs et maintiennent l'expression des gènes SDGs (Senescence-Down Regulated genes). Les flèches indiquent une régulation positive et les lignes une régulation négative (d'après Kusaba et al., 2013; Guo et Gan, 2005).

l'expression des gènes de la photosynthèse et à l'augmentation de l'activité de l'hexokinase (HXK) (Rolland et al., 2002; Zhang et Zhou, 2013). En effet, les plantes de tomates surexprimant l'enzyme HXK d'*Arabidopsis thaliana* sont plus sensibles aux glucides et présentent une sénescence foliaire précoce (Dai et al., 1999).

D'autres études ont montré qu'un faible apport d'azote associé à un fort apport de glucose induit rapidement la sénescence (Wingler et al., 2005). En outre, l'effet de la nutrition azotée sur la sénescence interagit aussi avec la lumière. En effet, une étude conduite par Ono et al. (1996) sur des plantules de tournesol cultivées avec deux niveaux d'éclairement ( $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  et  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) et deux niveaux d'azote (8 mM et 0,8 mM de  $\text{NO}_3^-$ ), montre que la carence azotée induit moins vite la sénescence chez les plantules cultivées sous faible éclairement, celle-ci étant incapables d'accumuler des glucides. Le rapport C:N a également un effet sur la sénescence. En effet, la sénescence peut être induite par une forte teneur en C associée à une faible teneur en N soit un fort rapport C:N (Wingler et al., 2005; Aoyama et al., 2014). Ainsi, une limitation en N minéral induit plus fortement la sénescence lorsqu'elle est combinée à un ajout de glucose (Wingler et al., 2005; Aoyama et al., 2014).

## b. Les hormones

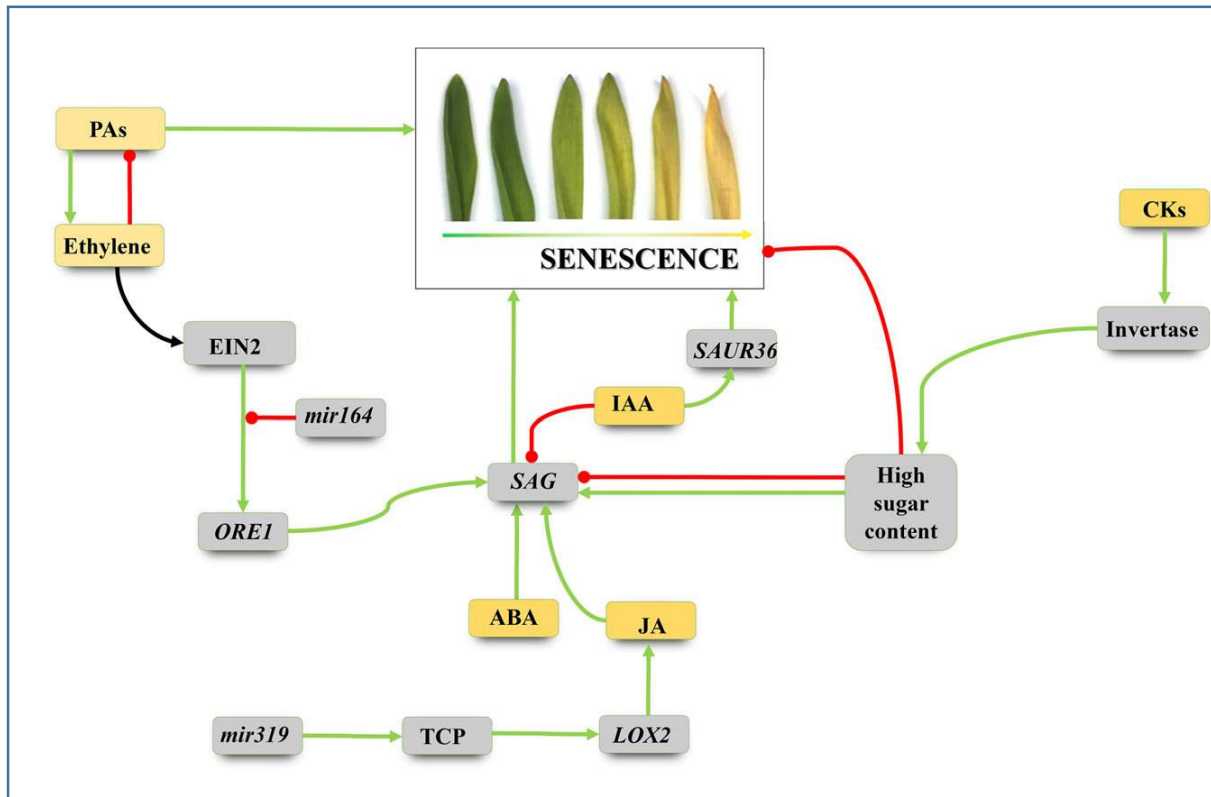
La contribution des phytohormones dans la régulation positive ou négative de la sénescence a également été largement étudiée (Thomas et Stoddart, 1980). D'une manière générale, les cytokinines, les auxines et les gibbérellines sont considérées comme des phytohormones «anti-sénescence» (Fischer, 2012), tandis que l'acide abscissique, l'éthylène, l'acide salicylique, les brassinostéroïdes, les strigolactones et l'acide jasmonique sont des hormones connues pour déclencher la sénescence (Figures I.8 et I.9).

### b.1. Les phytohormones régulant négativement la sénescence

#### i. Les cytokinines (CKs)

Les cytokinines jouent un rôle important dans la régulation de nombreux processus cellulaires, y compris la sénescence. Au niveau des feuilles, les CKs sont considérées comme des régulateurs négatifs de la sénescence (Lim et al., 2007; Hwang et al., 2012; Wojciechowska et al., 2018). En effet, des travaux réalisés chez *Arabidopsis thaliana* ont montré d'une part, une diminution des teneurs en cytokinines dans les feuilles sénescentes et d'autres part, qu'un apport de cytokinines exogène (ou endogène) permettait de retarder la





**Figure I.10: Voies de signalisation conduisant à la sénescence des feuilles.** Les flèches vertes indiquent une régulation positive et les lignes rouges une régulation négative de la sénescence. ABA, acide abscissique; CKs, Cytokinines; EIN2, Ethylene Insensitive 2; IAA, acide indole-3-acétique; JA, acide jasmonique; PAs, polyamines; SAGs, senescence-associated genes; TCPs, teosinte branched/cycloidea/PCF transcription factors (d'après Wojciechowska et al., 2017).

sénescence foliaire (**Zhang et Zhou, 2013**). Ainsi, une étude réalisée par **Gan et Amasino (1995)** sur des plantes de tabac surexprimant un gène codant l'isopentenyl transférase, enzyme impliquée dans la biosynthèse des cytokinines, a montré un retard de sénescence chez ces plantes transgéniques. De plus, ces auteurs ont montré que ce retard de sénescence s'accompagne d'une nette augmentation de la biomasse des plantes et surtout du rendement grainier avec une augmentation de plus de 50% par rapport au type sauvage. De plus, d'autres travaux réalisés chez le tabac (*Nicotiana tabacum*) ont montré qu'une application exogène de cytokinines s'accompagne d'une augmentation des teneurs endogènes en cytokinines, d'un retard de sénescence et d'une meilleure remobilisation des nutriments (**Lara et al., 2004; Sarwat et al., 2013**). À l'inverse, chez des lignées d'*Arabidopsis thaliana* surexprimant un gène codant une enzyme (une farnésyl diphosphate synthase : FPS) utilisant l'isopényl diphosphosphate (IPP : précurseur de la synthèse des cytokinines) comme substrat, la diminution des teneurs en IPP s'accompagne d'une initiation précoce de la sénescence foliaire (**Masferrer et al., 2002**).

## ii. Les auxines

Si l'implication des cytokinines dans la régulation de la sénescence foliaire est à ce jour bien établie, celle des auxines est sujette à controverse puisqu'il a été démontré que ces phytohormones peuvent accélérer ou retarder la sénescence (**Figure I.10**). En effet, une étude menée par **Van der Graaff (2006)** sur des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* a montré qu'au cours de leur sénescence, l'induction de l'expression de gènes codant des enzymes clés de la biosynthèse des auxines (tryptophane synthase [TSA1], l'acide indole-3-acétique [IAA] oxydase [AO1] et la nitrilase [NIT1-3]) conduit à une augmentation des teneurs en auxines.

Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que le signal auxine serait médié par le facteur de transcription ARF2 (Auxine Response Factor 2) au cours de la sénescence (**Lim et al., 2010; Ellis et al., 2005**). En outre, les auxines induisent l'expression du gène *SAUR36* (SMALL AUXIN UP RNA Gene) connu pour être surexprimé au cours de la sénescence (**Figure I.10; Hou et al., 2013**). Alors que ces études montrent que les auxines seraient plutôt des régulateurs positifs, plusieurs études suggèrent en revanche que les auxines sont des régulateurs négatifs de la sénescence. Ainsi, plusieurs auteurs ont montré qu'une application exogène d'auxines conduit à une répression de l'expression de gènes *SAGs* (**Figure II.9 et II.10; Noh et Amasino, 1999; Hong et al., 2000; Jones et al., 2010; Kim et al., 2011**).



Ces résultats contradictoires montrent bien que le rôle des auxines n'est clairement pas établi. En effet, d'autres études suggèrent que l'action de ces phytohormones entraînerait une modification de la balance hormonale impliquant notamment l'éthylène, une phytohormone dont l'action est antagoniste à celles des auxines (**Sexton et Roberts, 1982; Schippers et al., 2007**).

### iii. Les gibbérellines

Les gibbérellines (GAs) sont également connues pour participer à la régulation négative de la sénescence foliaire et plus particulièrement à la dégradation des chlorophylles et des protéines (**Sarwat et al., 2013**). Ainsi, chez de nombreuses espèces végétales telles que *Paris polyphylla*, *Catharanthus roseus* et *Dioscorea rotundata*, il a été montré que le catabolisme des chlorophylles est associé à la diminution de la teneur en gibbérelline endogène au cours de la sénescence (**Ile et al., 2006; Pandey et al., 2007; Li et al., 2010**). Par ailleurs, chez *Paris polyphyllan*, il a été montré qu'une application exogène de GA3 (pulvérisation hebdomadaire de 100 mg dm<sup>-3</sup>) conduit à une augmentation des teneurs endogènes de GA4+GA7 (9 ng g<sup>-1</sup> MF chez les témoins contre 50 ng g<sup>-1</sup> MF chez les plantes traitées) et à un ralentissement de la sénescence s'accompagnant notamment par une forte diminution de la dégradation des protéines (-42% 7 semaines après l'application de GA3), des chlorophylles et de l'activité lipoxygénase (**Li et al., 2010**).

Néanmoins, les GAs ne semblent pas exercer un rôle direct sur la sénescence mais agirait en combinaison avec l'acide abscissique (ABA), une phytohormone considérée comme un régulateur positif de la sénescence. En effet, une application d'un inhibiteur de la synthèse de GAs (paclobutrazol) conduit à une augmentation de la teneur en ABA (et à une diminution de celle des GAs) et se traduit par une accélération de la sénescence chez *P. polyphylla*, suggérant ainsi un rôle antagoniste du GA et de l'ABA (**Yu et al., 2009**).

## b.2. Les phytohormones régulant positivement la sénescence

Contrairement aux phytohormones présentées précédemment, l'acide abscissique (ABA), l'acide salicylique (SA), l'éthylène (ET), l'Acide jasmonique (JA), les brassinostéroïdes (BR) et les strigolactones (SL) correspondent à des hormones régulant positivement la sénescence foliaire (**Figure I.9; Lim et al., 2007; Kusaba et al., 2013; Sarwat et al., 2013; Khan et al., 2014; Wojciechowska et al., 2018**).



**i. Acide abscissique (ABA)**

L'implication de l'ABA dans la régulation positive de la sénescence foliaire est relativement bien établie. Ainsi, il a été démontré que les teneurs en ABA augmentaient dans les feuilles sénescentes et qu'une application exogène d'ABA induisait une augmentation de l'expression de plusieurs gènes *SAGs* (Zhang et al., 2012; Figure I.10) ainsi que la production de peroxyde d'hydrogène (Weaver et al., 1998; Lim et al., 2007; Choi et Hwang, 2011). De plus, une application exogène d'ABA s'accompagne d'une augmentation de la peroxydation lipidique et l'induction des activités des protéases et des RNases, des événements connus pour être associés à la sénescence (Panavas et al., 1998). Au niveau signalétique, l'ABA agit *via* un récepteur membranaire appelé RPK1 (receptor-like kinase) dont l'expression augmente au cours de la progression de la sénescence foliaire (Serwat et al., 2013). En outre, il a été démontré que des mutants Knoco-Out (KO)-RP1 d'*Arabidopsis thaliana* montrent une insensibilité à l'ABA se traduisant par une absence d'induction de la sénescence par cette phytohormone (Lee et al., 2011).

**ii. Acide salicylique (AS), éthylène, acide jasmonique (AJ) et autres phytohormones**

L'augmentation de la teneur en acide salicylique (SA) dans les feuilles sénescentes (environ 4 fois plus élevée que dans les feuilles non sénescentes) suggère une implication de cette phytohormone dans la régulation positive de la sénescence (Lim et al., 2003, 2007). Cette hypothèse est confortée par une étude réalisée par Morris et al. (2000) qui montre qu'un défaut de sa synthèse entraîne un retard de la sénescence et une diminution de l'expression du gène *SAG12* chez *Arabidopsis thaliana*.

L'éthylène est également connu pour induire la sénescence foliaire (Abeles et al., 1988) puisque de nombreux gènes impliqués dans sa synthèse sont induits durant la sénescence chez *Arabidopsis thaliana*. Ainsi, des mutants d'*Arabidopsis thaliana* insensibles à l'éthylène présentent un retard de sénescence par rapport au type sauvage (Lim et al., 2007). Par ailleurs, il a été observé une répression de plusieurs gènes *SAGs* (*SAG1*, *SAG2* et *SAG12*) associée à un retard dans la sénescence chez d'autres mutants présentant des perturbations dans la voie de signalisation de l'éthylène (mutants *etr1-1*, *ein2-1* et *ein1-1*; Grbić et Bleeker, 1995; Wojciechowska et al., 2018; Figure I.10).



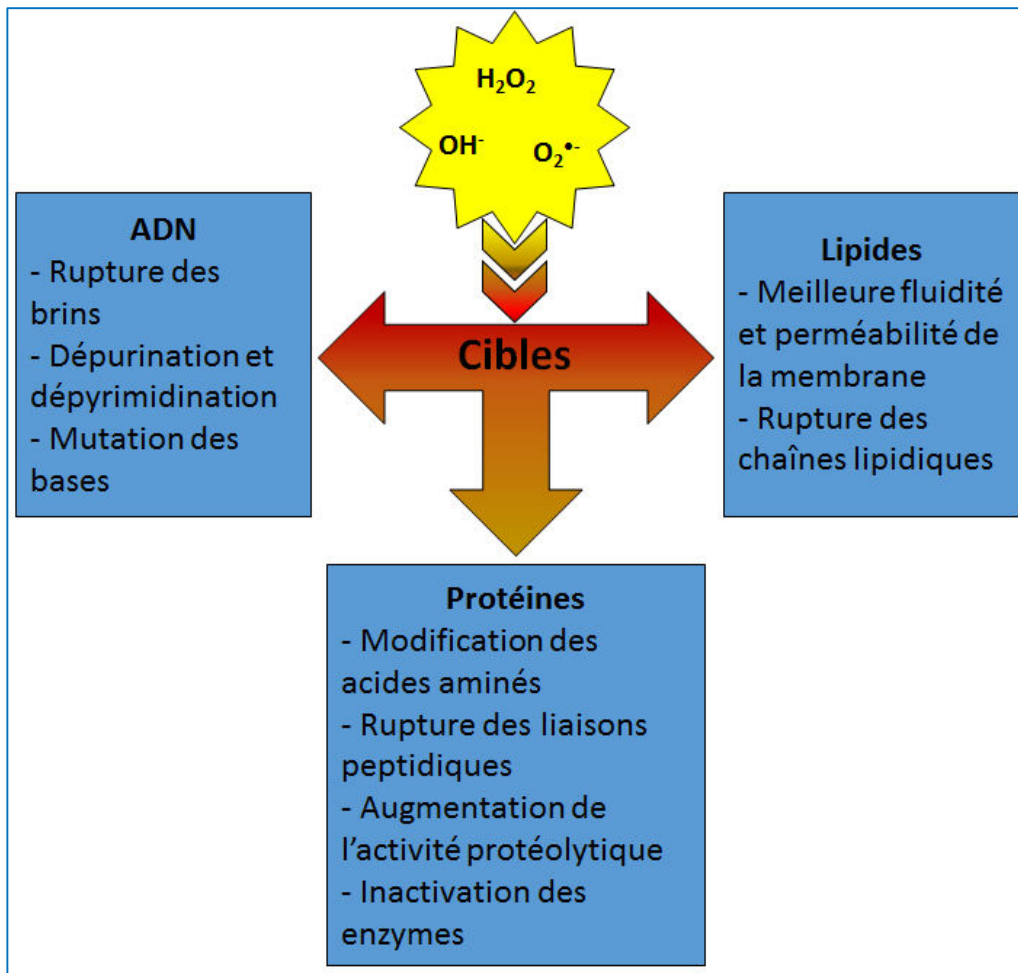
De nombreuses études indiquent également que l'acide jasmonique (AJ) et son dérivé volatil, le méthyl jasmonate (MeJA) régulent positivement la sénescence. En effet, chez *Arabidopsis thaliana*, les teneurs en AJ sont quatre fois plus élevées dans les feuilles sénescentes que dans les feuilles non sénescentes (He et al., 2002; Seltmann et al., 2010). De plus, une application exogène de MeJA entraîne une expression accrue des gènes *SAG* (Shan et al., 2011) et s'accompagne d'une induction de la sénescence foliaire chez *Arabidopsis thaliana* (He et al., 2002) et d'une augmentation de la remobilisation de l'azote chez le colza (Rossato et al., 2002; Desclos et al., 2008). Des études suggèrent que l'AJ serait produit lors de la dégradation de lipides membranaires ce qui expliquerait l'augmentation de ses teneurs durant la sénescence (Seltmann et al., 2010).

Enfin, des études, peu nombreuses à ce jour, montrent que d'autres phytohormones telles que les brassinostéroïdes (BRs) et les strigolactones (SLs) participent également à la régulation positive la sénescence. Ainsi, un mutant *det2* (gène codant une enzyme impliquée dans la synthèse des BRs) présente un phénotype « stay-green » chez *Arabidopsis thaliana* (Chory et al., 1994; Sarwat et al., 2013). Par ailleurs, les mutants *dad1* (déficients dans la synthèse de SLs), présentent également un phénotype « stay-green » chez *Petunia axillaris* (Snowden et al., 2005).

### iii. Les espèces réactives de l'oxygène (« Reactive Oxygen Species » : ROS)

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) jouent un rôle important dans la signalisation de la sénescence naturelle ou induite par des facteurs biotiques ou abiotiques (Bhattacharjee, 2005; Lee et al., 2011). La production des ROS est l'une des premières réponses de la plante au stress (Ahmad et al., 2010) et à la sénescence (Khanna-Chopra, 2012; Lee et al., 2012). Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et les radicaux libres tels que l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) et l'ion hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ) sont les principales ROS présentes dans les cellules. Dans des conditions normales, la production de ROS est maintenue à un faible niveau par des phénomènes de détoxification chimique impliquant de nombreux métabolites tels que le glutathion, l'ascorbate, la vitamine E, les caroténoïdes, les anthocyanes ou encore les flavonols ou l'intervention d'enzymes telles que les catalases, les peroxydases, la glutathion-S-transférase ou les superoxydes dismutases. Lorsqu'une plante est confrontée à un stress (biotique et/ou abiotique) ou lorsqu'un organe entre en sénescence, un déséquilibre cellulaire entre la production et le piégeage des ROS survient.





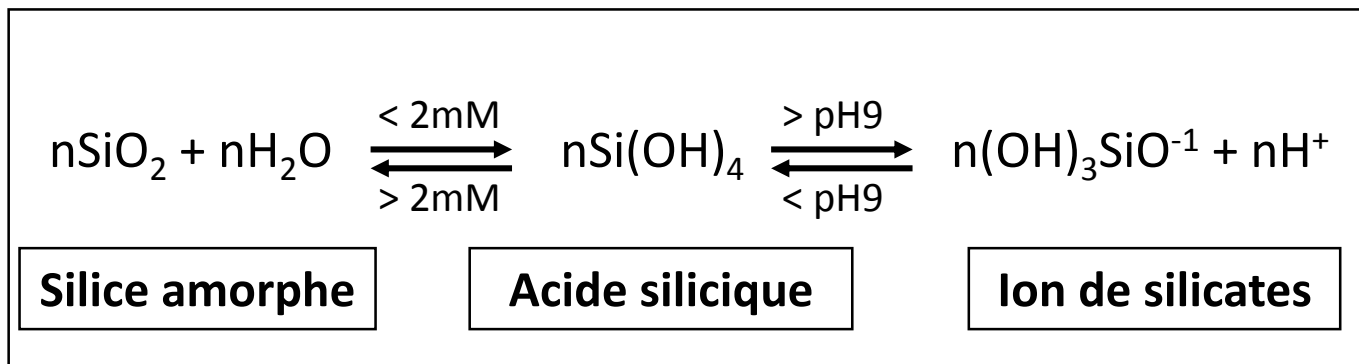
**Figure I.11: Les différentes cibles des espèces réactives de l'oxygène (ROS: « Reactive oxygen Species »).** Les ROS produits lors d'un stress oxydatif vont endommager les structures cellulaires telles que l'ADN, les lipides et les protéines menant ainsi à la mort des cellules (d'après Das et Roychoudhury, 2014).

Au niveau cellulaire, cette augmentation de ROS va engendrer des dommages importants qui conduiront à la mort des cellules (**Ahmad et al., 2010; Koyro et al., 2012; Kim et al., 2017**). Parmi ces dommages, peuvent être cités les oxydations de protéines, les inhibitions d'enzymes, les altérations de l'ADN, la peroxydation des lipides membranaires (notamment des acides gras polyinsaturés conduisant à la formation d'aldéhyde malonique [MDA]; **Figure I.11; Das et Roychoudhury, 2014**).

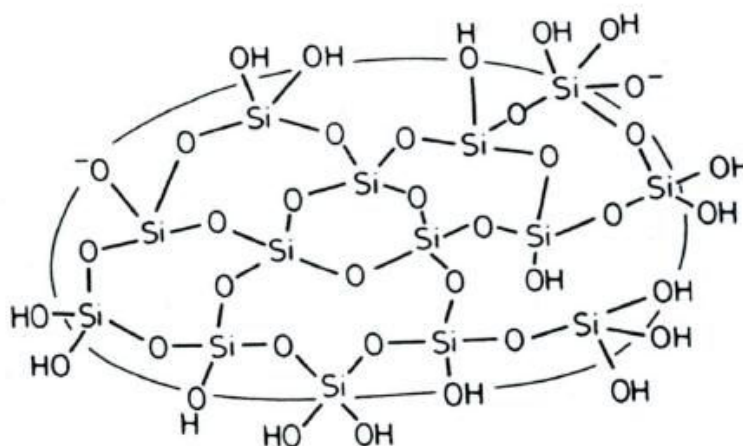
Par ailleurs, au sein d'une feuille, il a été montré que la production de ROS augmente dès lors que la feuille a atteint sa maturité, stade coïncidant avec la diminution de sa capacité à les piéger (**Inal et al., 2001**). Ainsi, les ROS et notamment le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), agirait comme des signaux cellulaires capables d'activer l'expression de gènes intervenant au cours de la sénescence tels que les gènes SAGs (**Navabpour et al., 2003; Jajic et al., 2015**).

## 2. Facteurs exogènes

Les facteurs environnementaux tels que les stress biotiques (non détaillés dans cette synthèse bibliographique) et abiotiques peuvent déclencher la sénescence foliaire. En effet, lorsque les plantes sont soumises à des stress, des modifications de la balance hormonale conduisent généralement à des modifications métaboliques qui se traduisent par l'initiation de la sénescence foliaire (**Watanabe, 2013; Zhang et Zhou, 2013**). Parmi les stress abiotiques, l'augmentation de la température, le stress hydrique ainsi que les carences en nutriments et notamment la privation en azote induisent la sénescence (**Tilsner et al., 2005; Wojciechowska et al., 2018**). Seule l'influence d'un stress nutritionnel sur la sénescence sera détaillée dans le cadre de cette analyse bibliographique. Par exemple, une limitation sévère en soufre (S) est connue pour induire la sénescence (**Abdellah et al., 2011**) alors qu'une privation modérée n'aura que peu d'impact voire un ralentissement de l'initiation de ce processus (**Dubousset et al., 2009 et 2010**). En effet, la sénescence foliaire des plantes de colza est 1,4 fois plus faible chez les plantes seulement carencées en soufre par rapport aux plantes présentant une carence en soufre et en azote (**Dubousset et al., 2009**). Par ailleurs, une restriction ou une privation en N connue pour affecter gravement les rendements des cultures (**Gregersen et al., 2013; Koeslin-Findeklee et al., 2015; Safavi-Rizi et al., 2018**) se manifeste également par une accélération de l'initiation de la sénescence, conséquence d'une dégradation accrue des chlorophylles et des protéines foliaires (**Etienne et al., 2007; Gombert et al., 2010**), mais également d'une augmentation du rapport C:N (**Wingler et al., 2006**).



**Figure I.12: Propriété chimique du silicium dans le sol.** Le silicium est présent sous forme de molécules monomériques non chargées (acide silicique) à un pH inférieur à 9. Lorsque le pH est supérieur à 9, celui-ci reste soluble jusqu'à une concentration de l'ordre de 2 mM. Au-delà, le Si polymérise et forme un gel de silice (silice amorphe).



**Figure I.13: Représentation schématique de la silice amorphe.** L'acide silicique dans le sol provient des aluminosilicates tels que les feldspaths et les micas. Lorsque la solution du sol est saturée en acide silicique, il y a formation de silice amorphe (d'après Epstein et al., 2001).

Chez de nombreuses espèces telles que le colza, il a également été montré que le stress hydrique est un stress abiotique capable d'induire les activités protéolytiques associées à la sénescence foliaire (Reviron et al., 1992; Ilami et al., 1997). Enfin, l'obscurité est également un stress environnemental souvent utilisé pour induire la sénescence foliaire. Récemment, Markovich et al. (2017) ont utilisé ce facteur environnemental pour induire la sénescence de feuilles détachées d'*Arabidopsis thaliana* surexprimant un gène codant un transporteur de silicium chez le riz (*Os-Lsi1*). Au cours de cette étude, ces auteurs ont montré d'une part, que l'initiation de la sénescence est associée à une diminution des teneurs foliaires en cytokinines et d'autre part, qu'un apport de silicium est capable de ralentir la sénescence induite par l'obscurité.

## II. Le silicium

### II.1. Le silicium dans le sol

Le silicium (Si) est un élément omniprésent dans le sol (Epstein, 1994; Ma and Yamaji, 2008) où il peut être présent sous deux formes : une forme solide et une forme soluble respectivement indisponible et disponible pour les plantes. La forme solide peut être divisée en deux catégories : les silicates complexés à d'autres éléments (tels que les silicates d'aluminium ou de fer, par exemple; Deer et al., 1992) et le quartz ( $\text{SiO}_2$ ). L'acide monosilicique ( $\text{Si(OH)}_4$ ) constitue la forme soluble lorsque sa concentration n'excède pas 2 mM (Figure I.12). Sa solubilité dépend de la valeur du pH du sol. A titre d'exemple, à un pH de 5,5, l'acide monosilicique n'est soluble que pour des concentrations inférieures à 1,7 mM. Lorsque le pH est fortement alcalin ( $> 9,5$ ), celui-ci peut rester soluble jusqu'à une concentration de l'ordre de 2mM (Datnouf et al., 2001; Ma et al., 2001). Au-delà, le Si polymérise et forme un gel (Figure I.13; Guérin, 2014; Hodson et al., 2005).

Dans la solution du sol, la concentration en acide monosilicique est généralement comprise entre 0,1 et 0,6 mM (Epstein, 1999). Ces faibles concentrations s'expliquent d'une part, par le fait que le Si soluble est prélevé par les racines à une vitesse plus élevée que celle à laquelle il est libéré dans le sol et d'autre part, par une adsorption du Si sur les colloïdes du sol (Jones et al., 1967).

### II.2. Le silicium chez les plantes



Chez les plantes, à l'exception des plantes de l'ordre des Equisétales qui accumulent de fortes quantités de Si (**Ma et Yamaji, 2008**), le Si n'est généralement pas considéré comme un élément essentiel.

Néanmoins, selon **Epstein et Bloom (2003)**, un élément est considéré comme essentiel s'il répond à au moins à l'un des deux critères suivants :

- ✓ l'élément fait partie de la structure de molécules impliquées dans le métabolisme de la plante,
- ✓ une déficience en cet élément entraîne une/des perturbation(s) du cycle de développement de la plante.

Plusieurs études ayant montré qu'une carence en Si peut causer différentes anomalies chez les plantes de grande culture se traduisant notamment par une réduction de la croissance (**Ma et al., 2002 et 2006; Ma et Yamaji 2008**), le Si peut donc être considéré, selon les critères mentionnés ci-dessus comme un élément essentiel chez certaines plantes telles que le blé ou encore le maïs (**Epstein, 1994; Ma et Yamaji 2008; Liang et al., 2015**).

Bien que toutes les plantes cultivées contiennent du Si, il existe une grande disparité de teneurs en Si dans les tissus végétaux en fonction des espèces. A titre d'exemple, celles-ci peuvent varier de 0,2 à 10 % de la matière sèche dans les parties aériennes, c'est à dire autant, voire plus, que certains macronutriments essentiels tels que le calcium, le magnésium ou le phosphore (**Epstein 1994; Epstein 1999**). Ainsi, il est possible de classer les plantes en trois catégories (**Jones et Handreck, 1967 ; Takahashi et al., 1990**):

- ✓ Les fortes accumulatrices: teneurs comprises entre 1,5% à 10% de la matière sèche (exemple : le riz, le maïs et blé),
- ✓ Les accumulatrices intermédiaires: teneurs comprises entre 0,5% à 1,5% de la matière sèche (exemple : le concombre),
- ✓ Les faibles accumulatrices: teneurs inférieures à 0,2% de la matière sèche (cas de la majorité des dicotylédones comme le colza ou la tomate).

### II.2.1. Mécanismes d'absorption et de transfert du Si

Les mécanismes impliqués dans l'absorption du Si et dans sa répartition dans les différents tissus de la plante ont été particulièrement bien étudiés, notamment chez les céréales (blé,



riz, orge, maïs) et le concombre (Raven, 2001; Casey et al., 2004; Meunier et al., 2003; Ma et Yamiji, 2006; Rains et al., 2006; Ma et Yamiji, 2015; Meharg et Meharg, 2015).

#### II.2.1.A. Absorption racinaire de Si

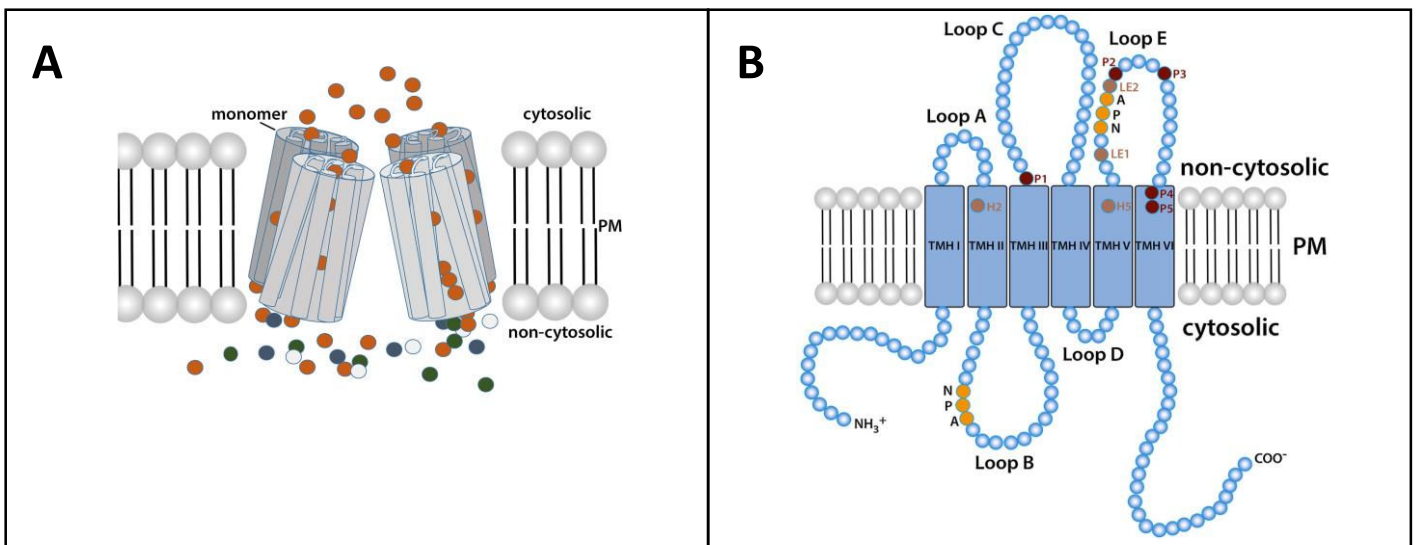
A la différence des autres ions minéraux, l'acide monosilicique est une molécule non chargée lorsque le pH de la solution du sol est inférieur à 9. De ce fait, il peut diffuser au travers la membrane plasmique des cellules racinaires. Il peut aussi être absorbé dans les cellules racinaires *via* des processus de diffusion facilitée (présence d'aquaporines). En effet, l'application racinaire de chlorure de mercure qui bloque la fonction de ces canaux engendre une chute de la concentration symplastique en Si des cellules racinaires à une valeur inférieure à celle mesurée au niveau de l'apoplaste chez le riz, le concombre et la tomate (Mitani et Ma, 2005).

Outre la diffusion passive, le Si peut être absorbé grâce à un transporteur, caractérisé pour la première fois chez le riz par Ma et al., 2006 par criblage de mutants présentant une faible absorption de Si. Ce transporteur spécifique, saturable par le Si, nommé OsLsi1 permet le prélèvement de Si de la solution du sol *via* un processus actif (Mitani et Ma, 2005). Chez d'autres espèces telles que le concombre et la tomate, il a été montré que l'absorption de Si s'effectue aussi *via* des transporteurs de type Lsi1 (Ma et Yamaji, 2006) et que l'appartenance de ces plantes à des groupes d'accumulateurs différents dépend essentiellement de leur densité au sein de la racine (riz>concombre>tomate) (Mitani et Ma, 2005; Ma et Yamaji, 2006).

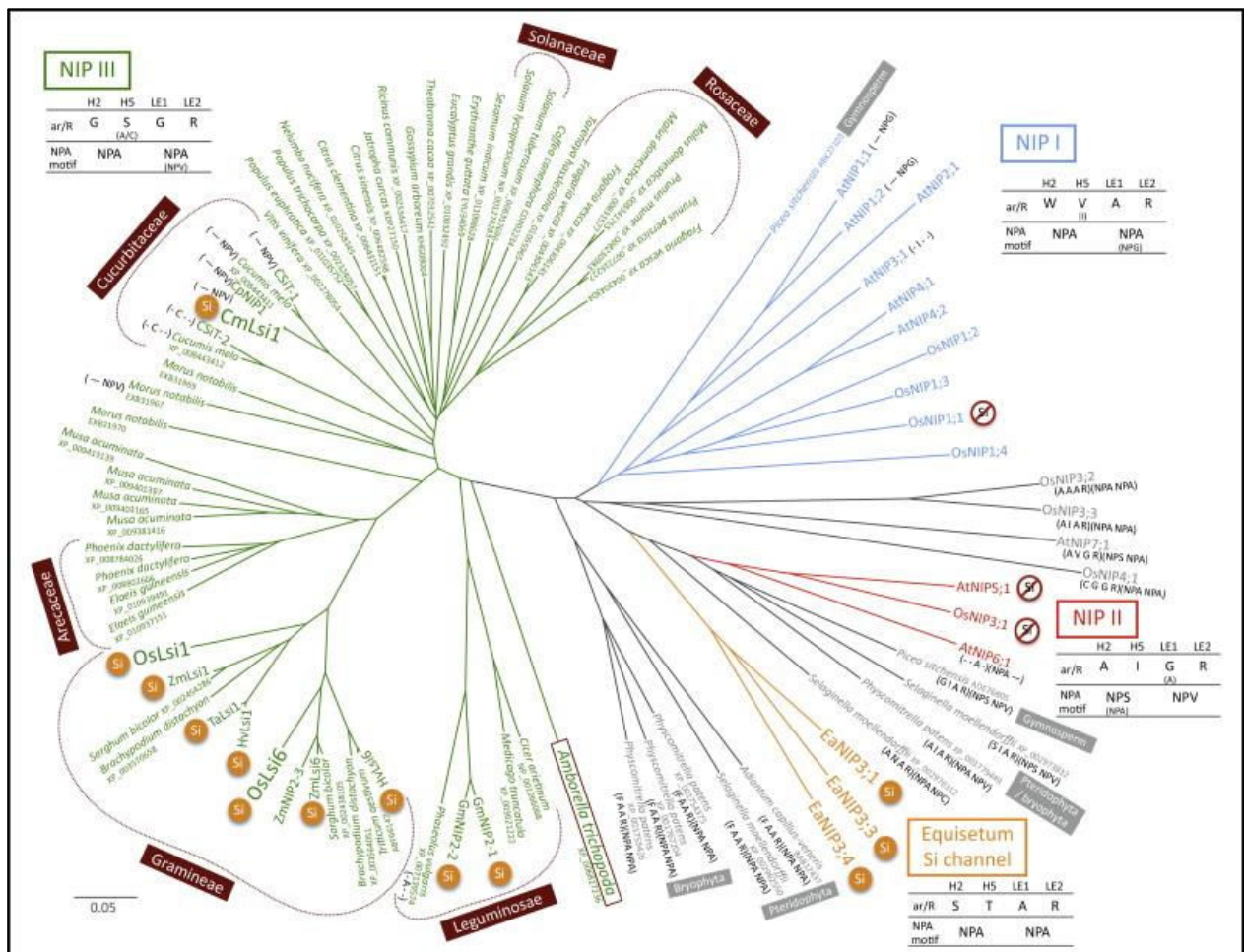
#### II.2.1.B. Transferts de Si dans la plante

Une fois dans les cellules de l'endoderme racinaire, le Si est pris en charge par un autre transporteur, nommé Lsi2, mis en évidence également pour la première fois chez le riz (Ma et al., 2006; Ma et Yamaji, 2015). Il permet le transfert du Si des cellules corticales vers le xylème (Ma et al., 2007; Ma et Yamaji, 2015). Toutefois, chez d'autres espèces telles que le concombre, le chargement en Si du xylème peut également se faire par diffusion passive à travers la membrane plasmique des cellules corticales (Ma et Yamaji, 2015). Une fois dans la stèle, une partie du Si est déposée au niveau des parois des cellules des vaisseaux xylémiques (Balasta et al., 1989) où il empêche la compression des vaisseaux lorsque le flux transpiratoire





**Figure I.14: Arrangement des quatre monomères de NIP dans la bicouche lipidique (A) et représentation d'un monomère de NIP (B).** Les canaux NIPs facilitent le passage spécifique des molécules qui sont représentées par des cercles de couleurs différentes. Les rectangles bleus représentent les hélices de la région transmembranaire (TMH: transmembrane helix regions). Les acides aminés NPA responsables de la sélectivité du substrat des NIPs sont représentés par les cercles oranges. H2, H5, LE2 marquent la position des acides aminés formant le filtre ar/R (ar/Arg; PM = membrane plasmique) (d'après Pommerrenig et al., 2015).



**Figure I.15: Arbre phylogénétique des transporteurs Lsi1 et leurs homologues dans le règne végétal.** Les sous-groupes NIP I, NIP II et NIP III des NIP des angiospermes, NIP3 des Equisétales et d'autres espèces végétales sont présentés. Les cercles oranges et les cercles rouges représentent respectivement les protéines permettant ou non l'absorption de Si. Les résidus d'acides aminés du filtre de sélectivité ar/R conservés et les deux motifs NPA de chaque sous-groupe sont présentés dans les tableaux (les exceptions sont indiquées entre parenthèses; d'après Ma et Yamaji, 2015).

est important. L'autre partie du Si est transférée vers les parties aériennes grâce au flux transpiratoire (**Ma et Takahashi, 2002**) et la présence de transporteurs Lsi6 responsable du déchargement du Si contenu dans le xylème vers les cellules foliaires parenchymateuses (**Yamaji et al., 2008**). A titre d'exemple, chez le riz, plus de 90% du Si absorbé est transporté vers les parties aériennes (**Ma et Takahashi, 2002**).

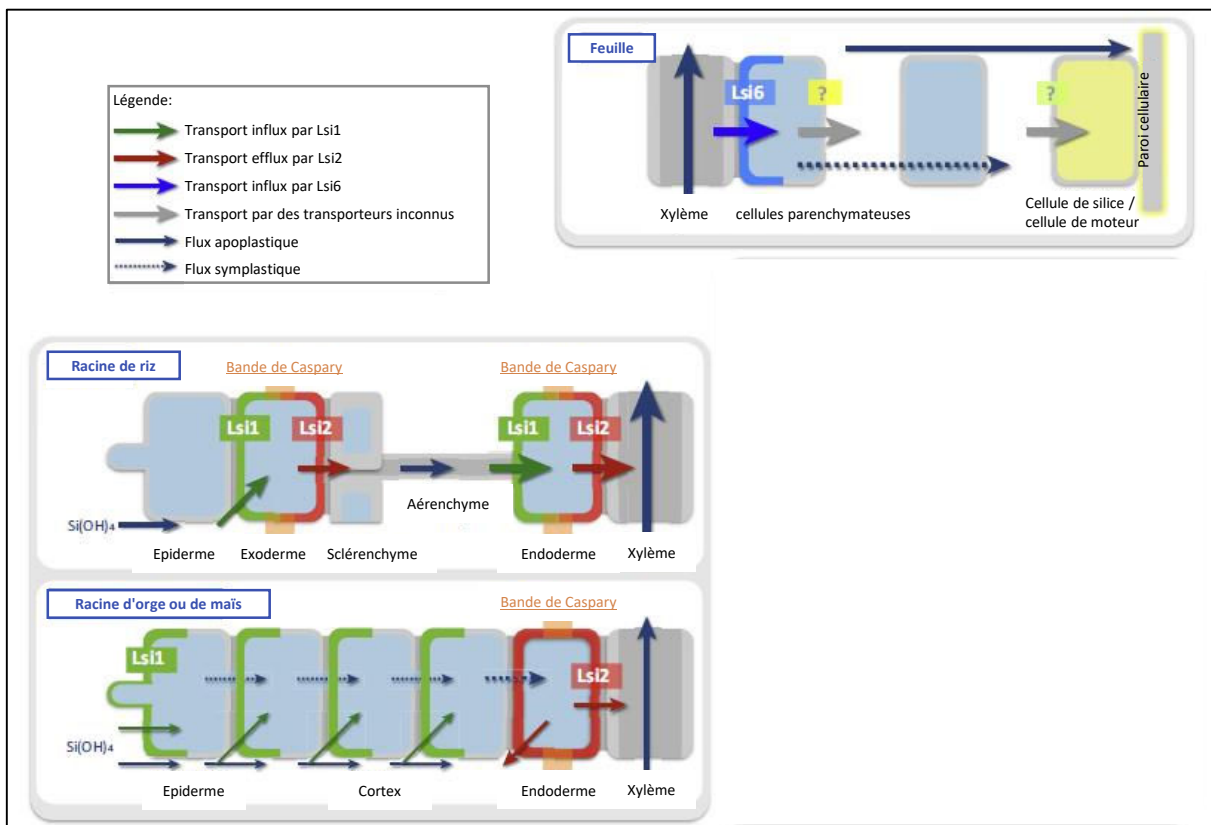
### II.2.1.C. Caractéristiques fonctionnelles des transporteurs de Si

Les transporteurs Lsi1 et Lsi6 appartiennent à la famille des aquaporines et à la sous-famille des Nodular-26-like Intrinsic Proteins (NIPs), qui assurent le transport de l'eau et/ou de petits solutés non chargés transportés de façon sélective, tels que le glycérol, l'acide lactique, l'ammoniac, l'acide borique, l'arsénite, le sélénite et l'acide silicique (**Wallace et Roberts, 2005; Zhao et al., 2010; Bienert et Chaumont, 2011**). Les NIPs sont des protéines tétramériques possédant six domaines transmembranaires (**Figure I.14**). La sélectivité des NIP est liée à la présence de deux motifs NPA (Asn-Pro-Ala) ainsi qu'à quatre acides aminés formant un filtre de sélectivité constitué d'un acide aminé aromatique et d'une arginine (**Wu et Beitz, 2007; Mitani-Ueno et al., 2011**).

Tous les transporteurs Lsi1 appartenant au groupe NIPIII possèdent un filtre composé de résidus GSGR (Gly-Ser-Gly-Arg; **Figure I.15**). Récemment, des transporteurs de Si appartenant à une autre sous-famille de NIPs ont été mis en évidence chez la prêle (*Equisetum arvense*; EaNIP3s; **Grégoire et al., 2002**), l'une des espèces végétales la plus accumulatrice de Si (**Ma et al., 2001; Hodson et al., 2005**). Contrairement aux autres transporteurs Lsi1, les EaNIP3s sont caractérisés par la présence d'un filtre de sélectivité distinct appelé STAR (Thr-Ala-Arg, **Figure I.15; Grégoire et al., 2012**).

Le transporteur Lsi2 a d'abord été identifié chez le riz (**Ma et al., 2007**), puis par la suite, des gènes orthologues ont été isolés chez l'orge (*HvLsi2*), le maïs (*ZmLsi2*; **Mitani et al., 2009a**) et la citrouille (*CmLsi2*; **Mitani et al., 2011**). Ils appartiennent à une famille de transporteurs putatifs d'anions non caractérisés à ce jour et possédant 11 domaines transmembranaires. Ces transporteurs présentent des similitudes avec le transporteur d'arsénite (ArsB) identifié chez les procaryotes (**Ma et al., 2007**).

Les transporteurs Lsi1 et Lsi2 sont exclusivement localisés au niveau racinaire. Plus précisément, chez le riz qui possède deux cadres de Caspari empêchant la diffusion de Si par



**Figure I.16: Représentation schématique de l'absorption, du chargement et du déchargement du Si chez le riz, l'orge et le maïs.** Le Si est absorbé *via* la présence des transporteurs Lsi1, puis transféré dans le xylème via l'intervention des transporteurs Lsi2. Dans les feuilles, le Si est déchargé grâce à l'intervention de transporteurs Lsi6. L'épaisseur des flèches représente la contribution des processus chez chacune des plantes étudiées (d'après Ma et Yamaji, 2015).

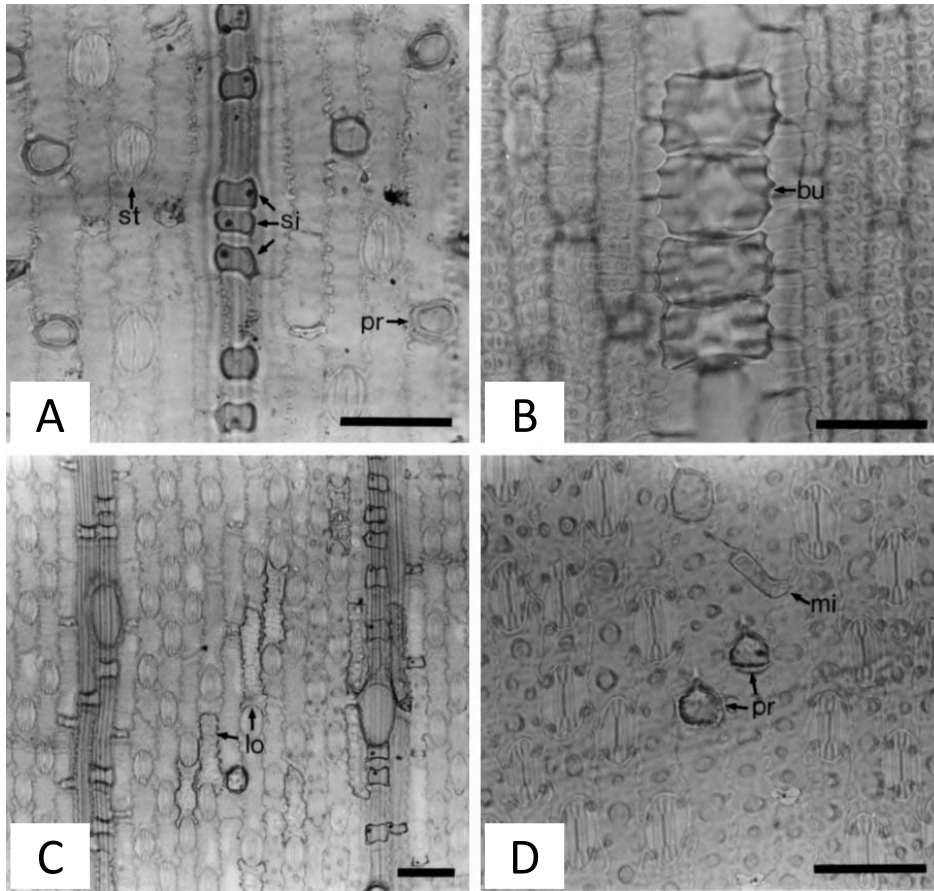
voie apoplastique, Lsi1 et le Lsi2 sont localisés au niveau de l'exoderme et de l'endoderme racinaires (**Ma et Yamaji, 2015**). L'absorption de Si au niveau de l'endoderme est assurée par le transporteur Lsi1 et son transfert vers l'exoderme se fait *via* le transporteur Lsi2. Par la suite, l'entrée de Si dans les cellules exodermiques se fait à nouveau grâce au transporteur Lsi1 et sa sortie vers les cellules xylémiques par le transporteur Lsi2 (**Figure I.16; Ma et al., 2006; Ma et al., 2007**).

Chez d'autres espèces comme l'orge et le maïs dont l'organisation cellulaire des racines est différente du riz, les transporteurs Lsi1 sont localisés au niveau des cellules épidermiques et des cellules corticales alors que les transporteurs Lsi2 sont localisés au niveau des cellules de l'endoderme (**Figure I.16**). Le Si disponible dans le sol est absorbé par les cellules épidermiques et/ou les cellules corticales grâce aux transporteurs Lsi1 (*HvLsi1* et *ZmLsi1* respectivement chez l'orge et le maïs). Une fois dans ces cellules, le Si est transféré d'une cellule à l'autre par voie symplastique jusqu'aux cellules de l'endoderme. Enfin, le chargement en Si du xylème depuis les cellules endodermiques se fait grâce à l'intervention des transporteurs Lsi2 (*HvLsi2* ou *ZmLsi2*, respectivement chez l'orge et le maïs) (**Figure I.16; Mitani et al., 2009a et 2009b**).

Bien qu'identifiés chez de nombreuses espèces de mono- et dicotylédones, à ce jour, aucun transporteur de Si n'a été mis en évidence chez les Brassicacées telles que le colza.

## II.2.2. Accumulation de Si chez les plantes

Le Si est le seul élément qui n'est pas toxique pour la plante lorsqu'il est accumulé en grande quantité dans les tissus. Après avoir été absorbé, il est déposé au niveau des parois cellulaires (**Yoshida, 1965; Ma et Takahashi, 2002; Raven, 2003**), au niveau des méats et des espaces intercellulaires (**Meunier et al., 2003**) sous forme de phytolithes (polymères amorphes de Si (**Motomura et al., 2000; Farooq et Dietz, 2015; Guerriero et al., 2016; Meunier et al., 2017**)). Ces phytolithes forment une double couche de silice au niveau de la paroi des cellules (**Ma et al., 2001**). Il existe deux types de cellules «silicifiées»: les «silica cells» et les «mortor cells» (**Figure I.17**). Les «silica cells» sont localisées au niveau des tissus vasculaires et ont une forme d'«haltère», tandis que les «motor cells» sont des cellules bulliformes présentes au niveau foliaires (notamment chez le riz; **Figure I.17**). Lorsque la teneur foliaire en Si dans les feuilles de riz est inférieure à 5%, seules les «silica cells» sont



**Figure I.17: Observation microscopique de la silice au niveau de l'épiderme des limbes des feuilles de *Pleioblastus chino*.** Les observations ont été réalisées sur la face adaxiale (A et B) et la face abaxiale des limbes (C et D). bu, cellule bulliforme (bulliform cell); lo, longue cellule (long cell); mi, micro-poils (micro hair); pr, poils épineux (prickle hair); si, cellule de silice (silica cell); st, stomate (**d'après Motomura et al., 2000**).

présentes alors que les «motor cells» apparaissent lorsque celle-ci est supérieure à 5%. Chez le riz, des «silica cells» sont également observées dans l'épiderme et les tissus vasculaires de la tige et des gaines (Ma et al., 2006).

### II.2.3. Les effets bénéfiques du Si

Bien que le Si ne soit pas considéré comme un élément essentiel pour les plantes, il est classé par de nombreux auteurs parmi les éléments leur étant bénéfiques (Guntzer et al., 2012a; Liang et al., 2015). En effet, le Si déposé au niveau de l'épiderme des feuilles et des tiges peut améliorer la croissance des plantes, accroître le rendement (Kuai et al., 2017) et augmenter leur résistance à différents stress biotiques et abiotiques (Côté-Beaulieu et al., 2009). Les effets bénéfiques du Si sont généralement seulement observés lorsque les plantes sont soumises à des stress biotiques et abiotiques.

#### II.2.3.A. Effets bénéfiques du Si chez les plantes soumises à stress biotique

De nombreuses études montrent qu'un apport de Si réduit la sévérité des maladies fongiques telles que le mildiou chez le blé et le riz, l'oïdium chez l'orge, le blé, le concombre et le melon (Miyake et Takahashi 1978). En outre, chez le riz, les dégâts causés par les cicadelles sont réduits chez les plantes ayant reçu du Si (+Si) comparativement aux plantes témoins (-Si) (Guével et al., 2007; Ma et Yamaji, 2015). Une autre étude réalisée par De Almeida et al. (2008) montre qu'une application foliaire de silicate de calcium pendant 30 jours entraîne une mortalité de *Thrips palmi*, réduisant ainsi les dommages causés par ce ravageur de l'aubergine. Le Si améliore également la résistance de la tomate aux fusarioses causées par *Fusarium oxysporum f. sp radicis-lycopersicib* (Huang et al., 2011).

#### II.2.4.B. Effets bénéfiques du Si chez les plantes soumises à un stress abiotique

Au cours des dernières décennies, il a été montré qu'un apport de Si permettait aux plantes de mieux tolérer au nombreux stress abiotiques tels que l'exposition aux basses et hautes températures (Agari et al., 1998, Epstein, 2001; Ma, 2004; Liang et al., 2007), le vent, la sécheresse, la salinité (Bybordi, 2012), la toxicité aux métaux lourds (Cd et Al, notamment) et la toxicité liée à l'excès de certains éléments nutritifs (Mn, Fe et P) (Ma et al., 2001). A titre d'exemple, des études montrent qu'un apport de Si améliore la tolérance du riz au stress salin (Match et al., 1991; Ma et al., 2001, Etesami et jeong, 2018).



Le Si est également connu pour atténuer les effets négatifs engendrés par une carence en P chez différentes plantes comme le riz et l'orge (**Datnoff et al., 2001**). Par ailleurs, un apport de Si a également des effets bénéfiques chez les plantes ayant reçu une fertilisation azotée trop importante. Ainsi, chez le riz, un excès de fertilisation N s'accompagne généralement d'une réduction de la verticalité des feuilles conduisant à une diminution de leur perception de la lumière et par conséquent, une diminution de leur activité photosynthétique. Ainsi, des travaux effectués chez le riz montrent que l'apport de Si améliore le port de feuilles (feuilles plus érigées) et diminue ainsi l'impact négatif de cet excès de fertilisation azotée (**Zanão Júnior et al., 2010; Tavakkoli et al., 2011**).

Chez de nombreuses espèces végétales (riz : **Agarie et al., 1998**; sorgho: **Sonobe et al., 2010**; concombre: **Hattori et al., 2008**; maïs: **Gao et al., 2006**; blé: **Gong et Chen, 2012**), il a été montré qu'un apport de Si augmente la tolérance à la sécheresse. Cet effet bénéfique se traduisant notamment par une réduction de la transpiration des plantes traitées, serait la conséquence de la formation de la double couche de silice au niveau de la paroi des cellules épidermiques foliaires (**Yoshida 1965; Wong et al., 1972; Matoh et al., 1991; Zhu et Gong, 2014; Coskun et al., 2016**). Cette réduction du flux transpiratoire est également suggérée par une étude de **Gong et al. (2003)** montrant que chez le blé soumis à un stress hydrique, les feuilles de plantes traitées au Si (+Si) sont plus épaisses que celles des plantes contrôles (-Si).

#### **II.2.4. Mode d'action du Silicium**

Même si l'effet bénéfique du Si en condition de stress est bien établi, son(ses) mode(s) d'action conduisant à l'amélioration de la tolérance des plantes aux stress reste(nt) mal connu(s). Ainsi, à ce jour, plusieurs hypothèses sont émises.

##### **II.2.4.A. Mode d'action du Si chez les plantes soumises à un stress biotique**

###### **a. Renforcement de la barrière physique**

Le Si accumulé sous forme amorphe au niveau cellulaire jouerait un rôle de barrière mécanique limitant la pénétration d'agents pathogènes (**Guerriero et al., 2016; Kim et al., 2002**). Ceci expliquerait son effet positif sur la résistance des plantes aux maladies puisque les sites primaires de polymérisation du Si (i.e. parois des cellules foliaires et des vaisseaux du xylème) correspondent aux voies d'infection privilégiées des agents pathogènes (**Fawe et al., 2001; Fauteux et al., 2005**).



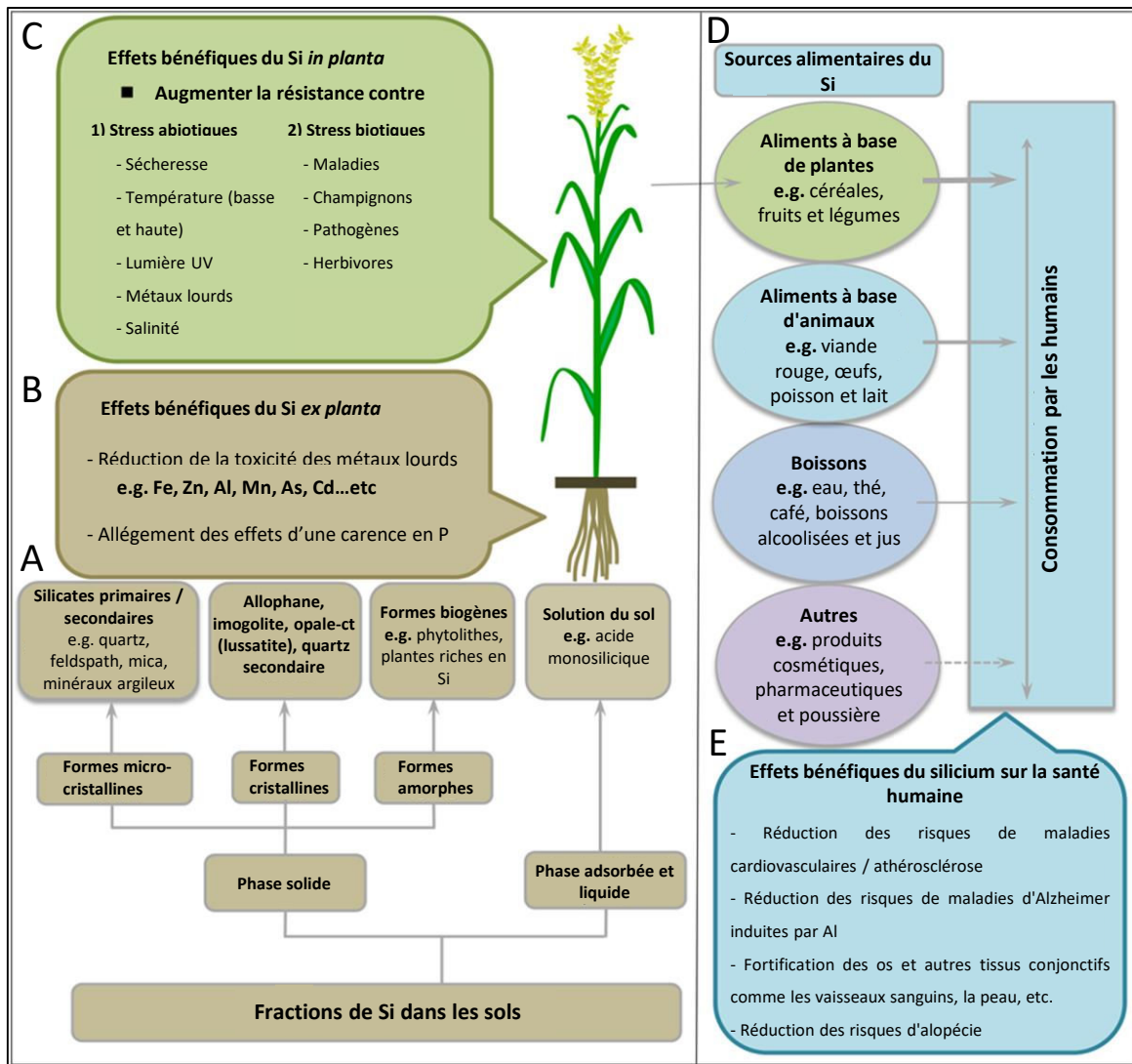


Figure I.18: Les différentes formes de Si présentes dans le sol (A). Effet bénéfique de l'acide monosilicique présent dans le sol (B) ou dans la plante (C). Source de Si pour l'alimentation humaine (D) et effet bénéfique pour la santé humaine (E) (d'après Farooqand et Dietz, 2015).

### b. Stimulation des mécanismes de défense

En plus de son rôle de barrière physique, le Si peut aussi augmenter la résistance des plantes aux stress en agissant sur certaines voies métaboliques (**Kim et al., 2002; Figure I.18 et I.19**). Ainsi, plusieurs études montrent qu'un apport de Si (racinaire ou foliaire) s'accompagne notamment (i) d'une induction de l'activité d'enzymes impliqués dans la défense des plantes, telles que les chitinases, les polyphénoloxydases (PPO), les glucanases, les peroxydases (POX), la phénylalanine ammoniac-lyase (PAL), et/ou (ii) d'une augmentation de la production de composés antimicrobiens, tels que les composés phénoliques, les flavonoïdes, les phytoalexines et les protéines PR (Pathogenesis Related Proteins). A titre d'exemple, une étude réalisée par **Fortunato et al. (2015)** montre que le Si augmente la résistance du soja à l'agent pathogène *Corynespora cassiicola* en induisant, au niveau des zones nécrotiques (sites d'infection), l'activité des chitinases, des  $\beta$ -1-3-glucanases, des PAL, des POX et des PPO. Dans ce cas, le Si agirait soit comme un « modulateur », c'est-à-dire un « stimulateur » ou un « activateur » des réactions de défense de la plante (voir § II.4). Par ailleurs, le Si permettrait d'améliorer la résistance systémique des plantes aux stress en induisant la synthèse de phytohormones, tels que l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (**Datnoff et al., 2001; Fauteux et al., 2005; Etesami et al., 2018**) capables de diffuser dans toute la plante (**Figure I.19**).

#### II.2.4.B. Mode d'action du Si chez les plantes soumises à un stress nutritionnel

Dans la littérature, les effets du Si sur la nutrition minérale des plantes concernent majoritairement le phosphate (P) et le potassium (K). Ainsi, le prélèvement par les plantes du P est stimulé par un apport de Si (**Ma, 2004; Eneji et al., 2008**). Ces effets seraient la conséquence de mécanismes induits *in planta* par le Si, comme par exemple une augmentation des phosphorylations (**Cheong et Chan, 1973**).

L'apport de Si améliore la disponibilité du potassium (K) dans le sol (**Chen et al., 2016**). Par ailleurs, une étude réalisée par **Miao et al. (2010)**, montre que l'application de Si chez des plantes de soja carencées en K engendre une meilleure croissance et un meilleur statut interne de K. L'apport de Si réduit aussi la peroxydation des lipides membranaires induite par une carence en K *via* une augmentation de l'activité d'enzymes antioxydantes (**Etesami et al., 2018**).

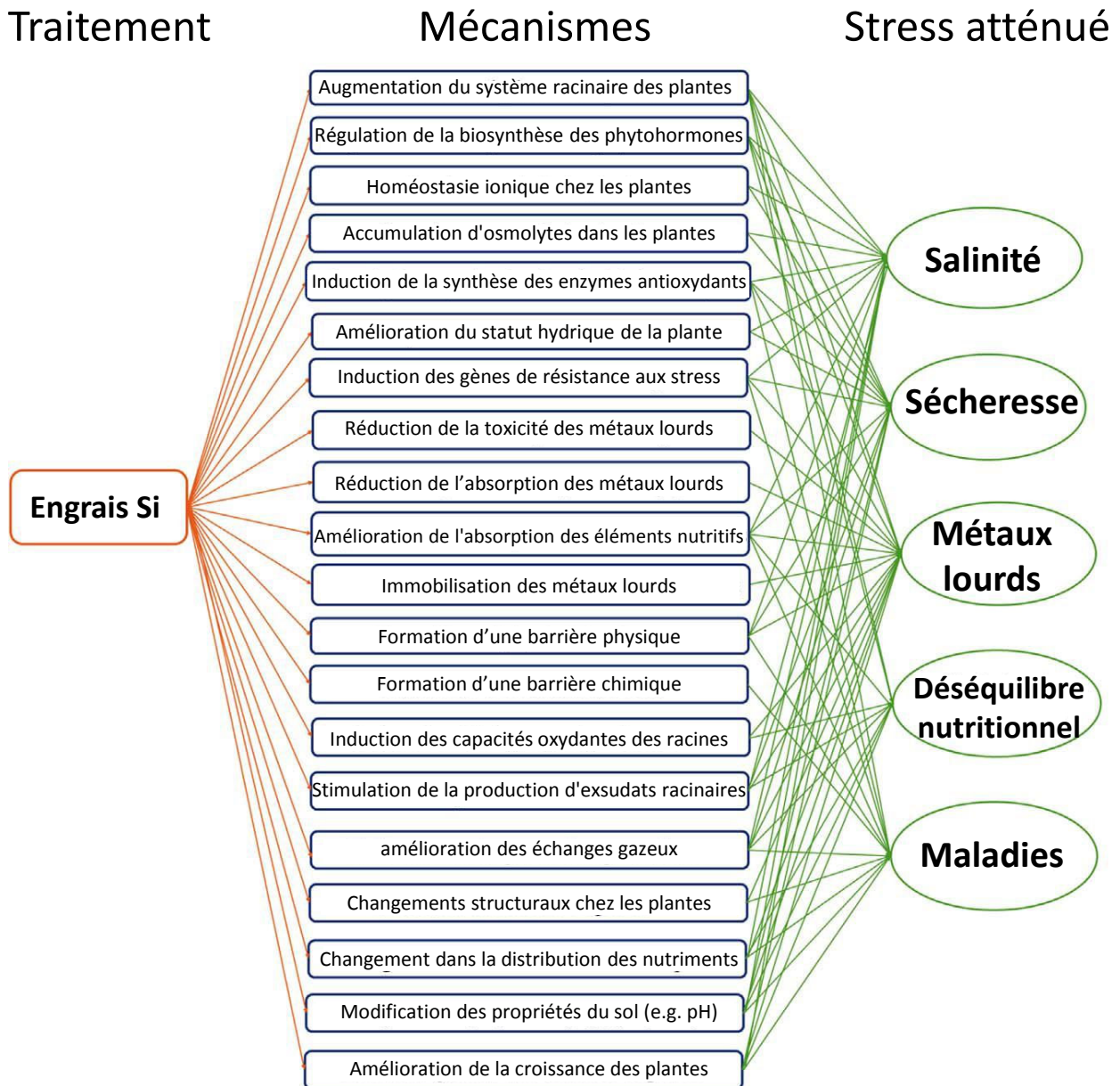


Figure I.19: Mécanismes d'action du silicium dans l'amélioration de la résistance des plantes aux stress biotiques et abiotiques (d'après Etesami et Jeong, 2018).

Outre les effets positifs avérés d'un apport de Si sur la nutrition potassique et phosphatée des plantes, il n'existe à notre connaissance aucune autre étude rapportant des effets du Si en réponse à d'autres carences en macronutriments. Dans ce travail de thèse, l'effet d'un apport en Si sur l'atténuation des effets d'un stress azoté a donc été étudié chez le colza (*Brassica napus* L.), une espèce de grande culture connue pour être particulièrement sensible à ce stress (car très exigeante en N) et peu accumulatrice de Si.

### **III. Problématique et objectifs de recherche**

Comme précisé dans cette synthèse bibliographique (cf §.1.2), en dépit de sa bonne capacité à absorber l'azote minéral, le colza présente une faible efficacité d'usage de cet élément (EUA) notamment à cause de sa mauvaise efficacité de remobilisation de l'N (ERA; **Malagoli et al., 2005a, b; Tilsner et al., 2005; Gombert et al., 2006**) lors de la sénescence séquentielle. Ainsi, au cours de la période végétative, les feuilles sénescentes chutent avec des teneurs en N résiduel élevées pouvant atteindre 2 à 3% de la matière sèche (**Rossato et al., 2001; Malagoli et al., 2005a et b**). Cette perte d'N affecte le rendement de la culture et contribue également à (i) la pollution des nappes phréatiques *via* la lixiviation du nitrate et (ii) la pollution de l'air *via* la production de GES (gaz à effet de serre) liés à la volatilisation de gaz tels le protoxyde d'azote. Une approche de modélisation visant à identifier les potentiels leviers d'amélioration de l'indice de récolte d'azote chez le colza, a montré qu'une augmentation de la durée de vie des feuilles permettrait un meilleur synchronisme entre la période de vidage de ces organes et le remplissage des grains qui pourrait conduire à une augmentation du rendement grainier d'environ 15% sans modifier les apports d'intrants N (**Malagoli et al., 2005b**).

Plusieurs études montrent des possibilités d'amélioration de l'Efficacité d'Usage de l'Azote (EUA) chez le colza, par exemple en agissant sur l'Efficacité d'Assimilation de l'Azote (EAA) et/ou sur l'Efficacité d'Absorption de l'Azote (EAbA) (**Schulte auf'm Erley et al., 2007; Good et Beatty, 2011**). Toutefois, dans un contexte de réduction des intrants azotés, l'optimisation de l'Efficacité de Remobilisation de l'Azote (ERA) des feuilles sénescentes est probablement l'un des principaux leviers pour améliorer l'Efficacité d'Utilisation de l'Azote



(EUtA) du colza. En effet, une augmentation de la remobilisation des organes sénescents ou de la durée de vie des feuilles, permettrait de mieux mobiliser l'N stocké dans ces organes sources et ainsi de limiter sa perte *via* la chute des feuilles sénescentes. De plus, une telle stratégie pourrait également conduire à un maintien, voire une augmentation, des rendements en réponse à de faibles apports d'intrants azotés (Malagoli et al., 2005b) et ainsi améliorer le bilan agro-environnemental de la culture du colza (Masclaux-Daubresse et al., 2010; Gregersen et al., 2013).

La remobilisation de l'azote lors de la sénescence apparaît donc comme un processus essentiel dans l'élaboration du rendement grainier du colza. En effet, une sénescence trop précoce induite par des facteurs exogènes (comme une carence en azote) provoque la chute précoce des organes végétatifs limitant ainsi la fourniture de nutriments aux organes en croissance (organes puits) et notamment les grains chez l'orge et le blé (Gregersen et al., 2008, Lobell et al., 2012). A l'inverse, une sénescence foliaire retardée permet de maintenir l'activité photosynthétique de la plante et ainsi, la production de molécules carbonées nécessaires à l'élaboration du rendement (Richards, 2000; Long et al., 2006).

Dans un contexte de limitation des apports azotés et d'optimisation de l'EUA ou plus précisément de l'ERA du colza, une modification des pratiques culturales consistant à effectuer un apport de silicium représente une alternative particulièrement intéressante. En effet, outre les études montrant un effet bénéfique d'un apport de Si pour améliorer la résistance aux stress biotiques et abiotiques (Frew et al., 2018), une étude récente montre pour la première fois qu'un apport de Si effectué sur des feuilles détachées d'*Arabidopsis thaliana* sur-exprimant un transporteur de Si de riz (*OsLsi1*), s'accompagne d'un retard de sénescence foliaire (Markovich et al., 2017). Cette étude constitue une piste de recherche très intéressante pour améliorer le bilan agro-environnemental de la culture du colza.

La thématique de recherche développée au cours de cette thèse a consisté, dans un premier temps, à **étudier les effets d'un apport de Si sur la sénescence séquentielle et l'absorption d'azote chez de colza (*Brassica napus* L.) soumis ou non à une privation en N.** (Article 1 publié dans *Frontiers in Plant Science* : doi : 10.3389/fpls.2018.00516).

Dans un deuxième temps, **une expérimentation a été réalisée sur un dispositif de cases lysimétriques d'une part, pour valider, en conditions de plein champ, les résultats obtenus**



**en conditions contrôlées et d'autre part, pour évaluer l'impact d'un apport de Si (12 Kg ha<sup>-1</sup>) sur les performances agronomiques du colza et notamment son rendement et la qualité de ses graines** (Article 2 : en cours d'expertise dans « *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* »).

Enfin dans une dernière partie, une étude **visant à mieux appréhender l'impact d'un apport de Si sur la régulation du transcriptome racinaire de plantes de colza cultivées en hydroponie** est présentée sous la forme d'un article actuellement en préparation.

Les travaux conduits au cours de cette thèse ont d'ores et déjà fait l'objet de plusieurs communications orales et affichées dans des congrès nationaux et internationaux :

- ✓ Haddad, C., Arkoun, M., A., Yvin, J. C., Etienne, P. & Laîné, P. (16 au 17 mars 2017). Effect of silicon on foliar senescence and nitrogen remobilization in *Brassica napus* L. 20<sup>ème</sup> Journées de l'école doctorale (EdNBISE) au Havre (France). Poster
- ✓ Haddad, C., Arkoun, M., A., Yvin, J. C., Etienne, P. & Laîné, P. (12 au 13 juillet 2017). Effect of silicon on growth and nitrogen nutrition of *Brassica napus* L. Journées SFR Normandie Végétale à Rouen (France). Poster.
- ✓ Haddad, C., Arkoun, M., A., Yvin, J. C., Etienne, P. & Laîné, P. (21 au 24 août 2017). Effect of silicon on foliar senescence and nitrogen remobilization in *Brassica napus* L. 18<sup>th</sup> International Plant Nutrition Colloquium (IPNC) à Copenhague (Danemark). Poster.
- ✓ **Haddad, C., Arkoun, M., A., Yvin, J. C., Etienne, P. & Laîné, P. (27 au 30 novembre 2017). Silicon increases leaf life span in N-deprived *Brassica napus* L.. 3<sup>rd</sup> biostimulants world congress en Floride (États-Unis). Poster (Prix du meilleur poster).**
- ✓ Haddad, C., Arkoun, M., Jamois, F., SCHAWARZBENBERG, A., Yvin, J. C., Etienne, P. & Laîné. (22 au 23 mars 2018). Effect of Silicon supply on leaf senescence in nitrogen deprived *Brassica napus* L. plants. 21<sup>ième</sup> Journées de l'école doctorale (EdNBISE) à Rouen (France). Communication orale.
- ✓ Haddad, C., Arkoun, M., A., Yvin, J. C., Etienne, P. & Laîné, P. (17 au 18 Mai 2018). Silicon promotes a delay of leaf senescence of *Brassica napus* L. grown in nitrogen deficiency. Journées SFR Normandie Végétale à Deauville (France). Poster.
- ✓ Haddad, C., Arkoun, M., A., Yvin, J. C., Etienne, P. & Laîné, P. (25 au 27 Juin 2018).





Silicon increases leaf life span in N-deprived *Brassica napus* L. 20th Nitrogen Workshop  
à Rennes (France). Présentation orale.



# Chapitre II :

## Matériels et Méthodes



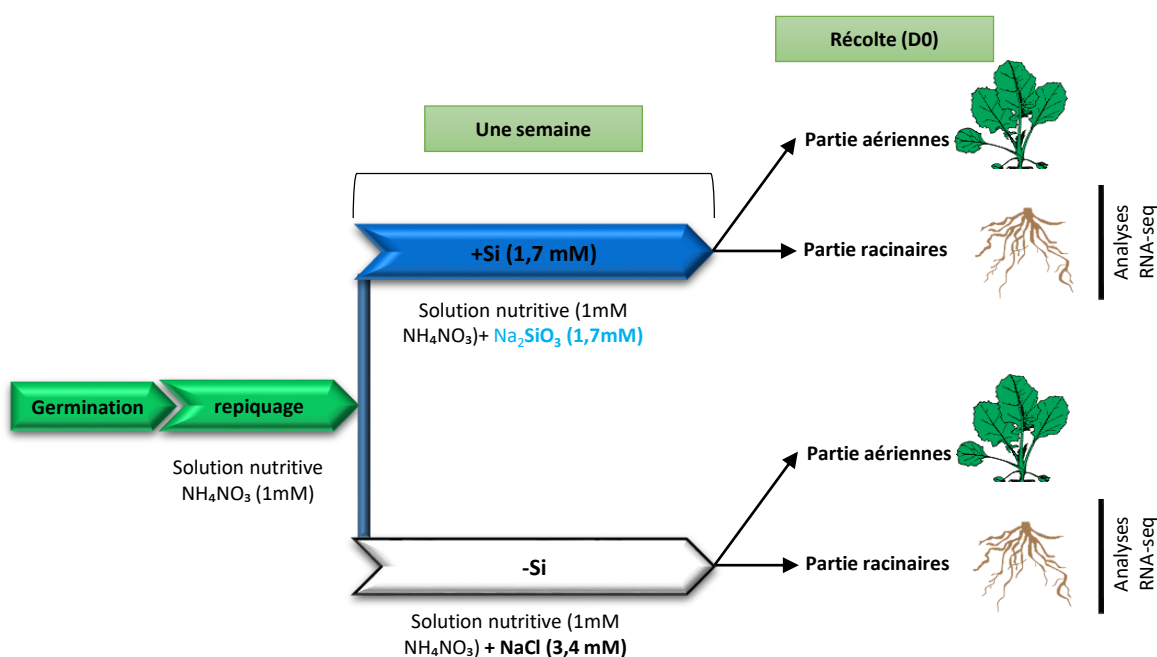
# Chapitre II :

## Matériels et Méthodes

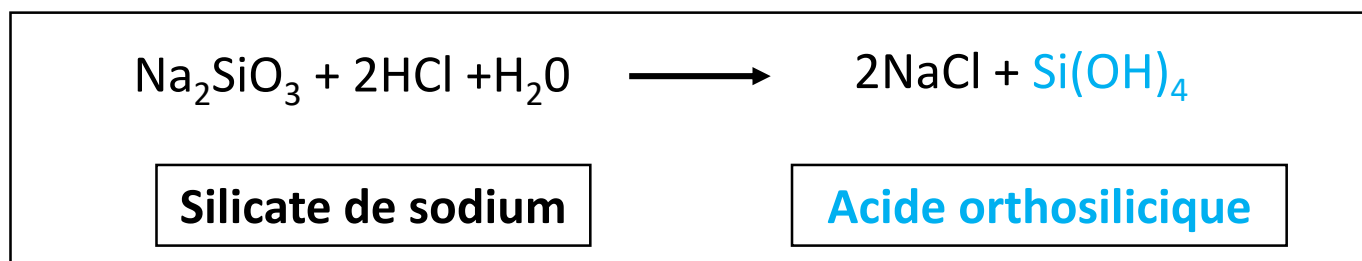
**Tableau II.1: Composition de la solution nutritive utilisée pour les cultures réalisées en conditions contrôlées.**

Macroéléments	[conc finale] mM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,15
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	3
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,5
EDTA, 2NaFe, 3H <sub>2</sub> O	0,2
KCl	1
MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,5
CaCO <sub>3</sub>	0,9

Oligoéléments	[conc finale] μM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	14
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	5
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	3
NiCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	1
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,7
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,7
CoCl <sub>2</sub>	0,1



**Figure II.1: Protocole expérimental suivi pour la réalisation des analyses transcriptomiques et métabolomiques.** les plantes de colza sont cultivées en hydroponie avec une solution nutritive contenant 1mM de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Après la formation de la 4<sup>ème</sup> feuille vraie, les plantes sont réparties en deux lots: le premier reçoit un apport de 1,7 mM de Si (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>), tandis que le deuxième lot ne reçoit pas de Si (-Si; témoin). Après une semaine de culture (D0), les plantes sont récoltées, les parties racinaires étant séparées des parties aériennes. Les analyses transcriptomiques sont réalisées sur les échantillons racinaires.



**Figure II.2: Formation d'acide orthosilicique (Si(OH)<sub>4</sub>) à partir de silicate de sodium (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>) en solution aqueuse acide (pH 5,6) (adapté d'après Yamagata *et al.*, 2012).**

## Chapitre II : Matériels et méthodes

Le silicium (Si) étant un élément constitutif du verre, les expérimentations et dosages décrits ci-après ont été réalisés en utilisant du matériel de laboratoire en polypropylène pour limiter les contaminations.

### **I. Matériel végétal et conditions de culture**

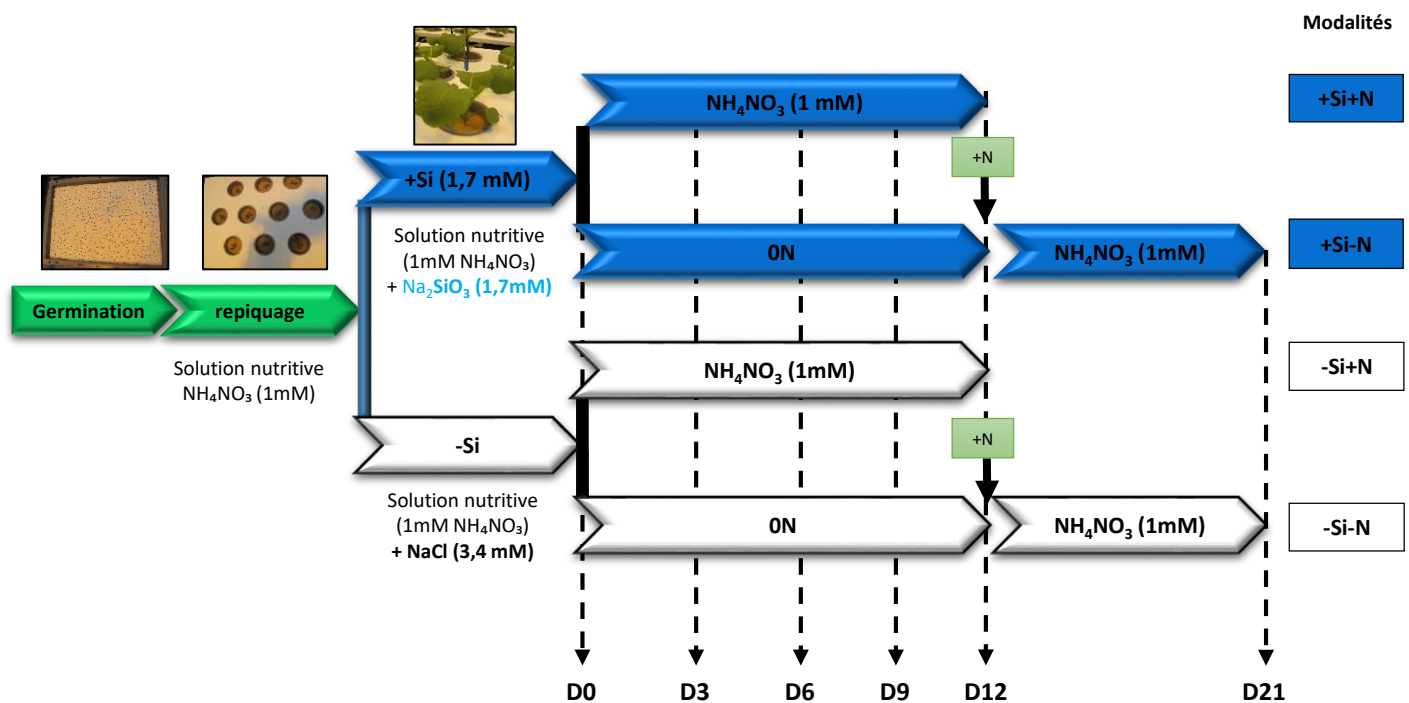
#### **I.1. Culture des plantes en conditions contrôlées (articles 1 et 3)**

Des graines de colza d'hiver variété « Citizzen » sont stérilisées en surface avec de l'éthanol (80% v/v) pendant 30 secondes puis avec de l'hypochlorite de sodium (20% v/v) pendant 20 minutes sous agitation avant d'être rincées abondamment à l'eau osmosée. Ces graines sont ensuite mises à germer sur de la perlite imbibée d'eau osmosée pendant 4 jours à l'obscurité. Puis, les plantules sont exposées à la lumière naturelle en présence d'une solution nutritive dont la composition est décrite dans le **Tableau II.1**. Juste après l'émergence de la première feuille vraie (au bout de 2 semaines), les plantules sont transférées dans des bacs en plastique contenant 20L de solution nutritive (**Tableau II.1**) et exposées à la lumière naturelle supplémentée par des lampes à vapeur de sodium haute pression (MASTER GreenPower T400W, Philips) dispensant un rayonnement photosynthétiquement actif (PAR, « Photosynthetically Active Radiation ») d'environ  $450 \mu\text{moles de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  au niveau de la canopée. La thermopériode et la photopériode appliquées sont de 20°C/16h (jour) et 15°C/8h (nuit). Après l'émergence des quatre premières feuilles vraies, les plantes sont séparées en deux lots :

- un premier lot de plantes (+Si; **Figure II.1**) est cultivé en présence de la solution nutritive décrite précédemment (**Tableau II.1**) à laquelle est additionné du Si (+Si) sous forme de silicate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3, 9\text{H}_2\text{O}$ ) à raison de 1,7mM. 600 ml de HCl (0.1 M) sont ajoutés dans chacun des bacs afin de permettre, la formation d'acide orthosilicique ( $\text{Si}(\text{OH})_4$ ) forme de Si absorbable par les plantes, à partir du silicate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ), (**Figure II.2**).

- un second lot de plantes (-Si; témoin; **Figure II.1**) est cultivé avec la même solution nutritive (**Tableau II.1**) à laquelle est ajouté une solution de NaCl (3,4 mM) afin de compenser l'apport de NaCl lié à la formation d'acide d'orthosilicique (coproduit de la réaction; **Figure II.2**) obtenu en condition +Si.





**Figure II.3: Protocole expérimental suivi pour l'étude de l'effet d'un apport de Si sur la sénescence foliaire du colza induite par une privation en N.** Après leur germination, les plantules de colza sont cultivées en hydroponie avec une solution nutritive contenant 1 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Les plantes sont ensuite réparties en deux lots: un lot prétraité avec 1,7 mM de Si (+Si) et l'autre sans Si (-Si). Après une semaine (D0), les plantes sont à nouveau séparées en deux: la moitié de chacun des deux lots précédents (+Si et -Si) est maintenu sur 1mM de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (-Si+N et +Si+N) tandis que l'autre moitié est soumise à une privation en N afin d'induire la sénescence foliaire (-Si-N et +Si-N). Après 12 jours (D12) les plantes privées d'N sont réalimentées pendant 9 jours (D21) avec une solution nutritive contenant 1 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> dans le but de suivre leur capacité de récupération suite à un stress azoté. Les plantes sont récoltées à 0, 3, 6, 9, 12 et 21 jours après le prétraitement Si (D0).

Les solutions nutritives sont continuellement aérées, renouvelées tous les 3 jours et leur pH est contrôlé et ajusté si besoin à 5,6. Pour les expérimentations présentées dans l'article 3, les plantes sont récoltées après une période de prétraitement au Si d'une semaine (D0; **Figure II.1**). Pour les expérimentations présentées dans l'article 1, les plantes sont, après cette période de prétraitement au Si (D0), à nouveau réparties en deux lots : la moitié de chaque lot de plantes (-Si et +Si) est maintenue sur une solution contenant 1 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (-Si+N; +Si+N), alors que l'autre moitié est privée en N (0N; -Si-N; +Si-N) pendant 12 jours (D12) afin notamment d'étudier l'effet d'un prétraitement en Si sur la progression de la sénescence foliaire induite par la privation en N (**Figure II.3**).

Les plantes privées en azote (-Si-N; +Si-N) sont ensuite réalimentées en azote (1mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) pendant 9 jours (D21) dans le but d'étudier l'effet du prétraitement Si sur leur capacité « à récupérer » après une période de privation N (**Figure II.3**).

## **I.2. Culture des plantes en conditions de plein champ (cases lysométriques; article 2)**

Cette expérimentation menée en conditions plein champ est réalisée sur le dispositif de cases lysométriques situé à Lieury (Commune de l'Oudon, Calvados). Des graines de colza (*Brassica napus* L. variété « Citizzen ») ont été semées le 17 septembre 2017 (**Figure II.4**) dans une pépinière située à proximité des cases lysométriques. Après l'apparition de la 4<sup>ème</sup> feuille vraie, les plantules sont repiquées dans 15 cases lysométriques (superficie : 1,96 m<sup>2</sup>, profondeur de sol : 1,10 m) à une densité de 60 plantes par case, soit 30 plantes/m<sup>2</sup> (**Figures II.4 et II.5**).

Au stade C1 (stade reprise de végétation; 17 mars 2017), toutes les cases lysométriques sont fertilisées avec 40 kg ha<sup>-1</sup> de Phosphore (sous forme de  $\text{P}_2\text{O}_5$ ), 50 kg ha<sup>-1</sup> de Potassium (sous forme de  $\text{K}_2\text{O}$ ) et 30 kg ha<sup>-1</sup> de Soufre (sous forme de  $\text{MgSO}_4$ ) (**Figure II.5**). A la même date, 6 cases reçoivent une fertilisation N (sous forme de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) de 30 kg ha<sup>-1</sup>, 6 autres cases reçoivent une fertilisation de 80 kg ha<sup>-1</sup> tandis que les 3 dernières, qui constitueront le traitement 0N, ne reçoivent aucune dose d'azote. Le 31 mars 2017, un deuxième apport de 30 ou 80 kg de N ha<sup>-1</sup> est réalisé seulement sur les cases précédemment fertilisées en N de manière à obtenir une fertilisation N finale de 60 (60N) et 160 (160N) kg de N ha<sup>-1</sup> (**Figure II.5**).



Figure II.4: Photographie d'une case lysimétrique après repiquage des plantes de colza.

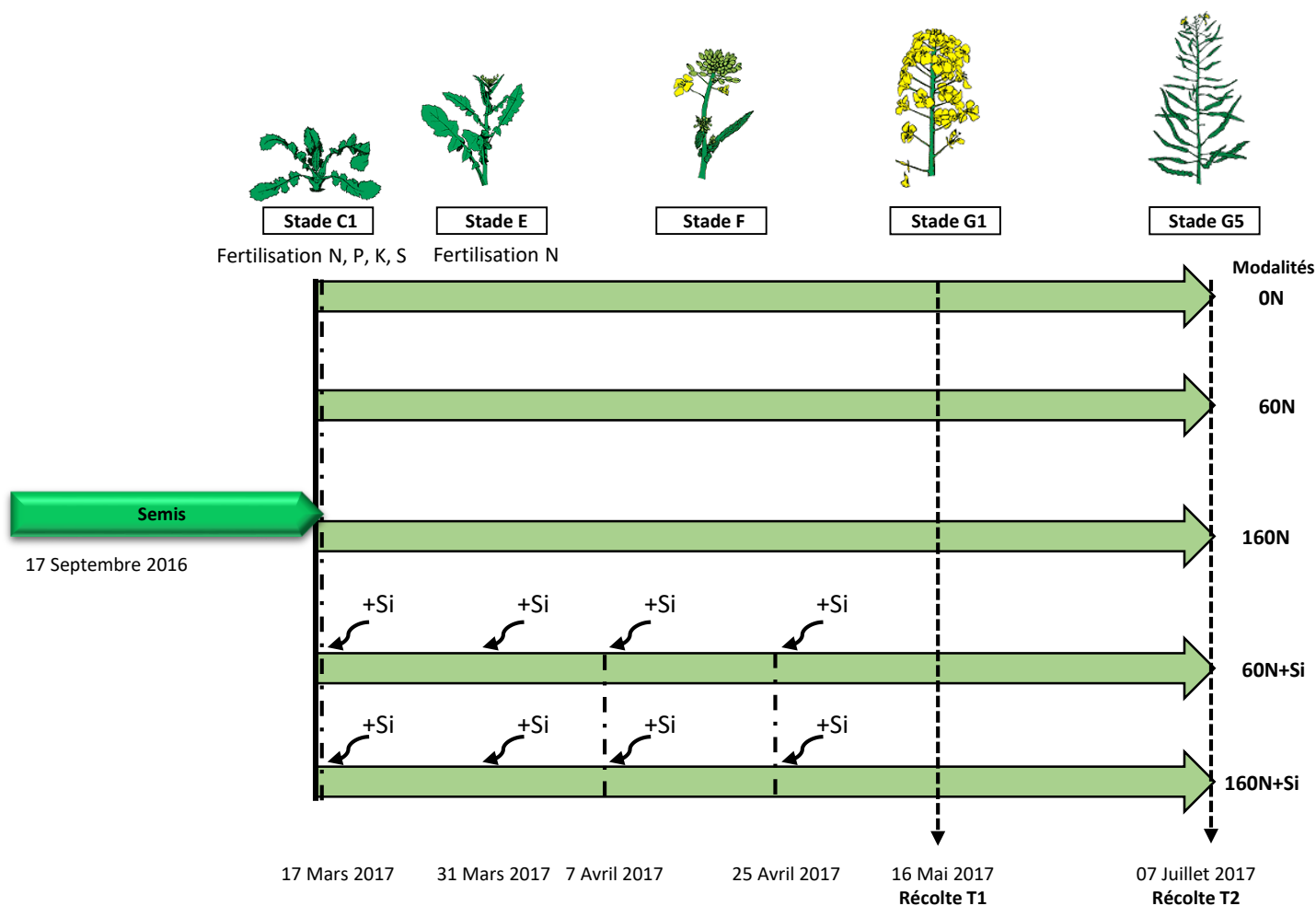


Figure II.5: Protocole expérimental mis en place pour étudier l'effet d'un apport de Si chez des plantes de colza cultivées en conditions de plein champ. Des plantules de colza (*Brassica napus* L. variété « Citizzen ») provenant de graines semées le 17 septembre 2016 dans une pépinière située à proximité des cases lysimétriques sont repiquées (stade 4<sup>ème</sup> feuille vraie apparente) sur des cases lysimétriques (17 mars 2017) à une densité de 30 plantes/m<sup>2</sup> (surface de la case: 1,96 m<sup>2</sup>). A cette même date, toutes les cases lysimétriques sont fertilisées avec 40 kg ha<sup>-1</sup> de Phosphore (sous forme de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), 50 kg ha<sup>-1</sup> de Potassium (sous forme de K<sub>2</sub>O) et 30 kg ha<sup>-1</sup> de Soufre (sous forme de MgSO<sub>4</sub>). De plus, 6 cases reçoivent une fertilisation N (sous forme de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) de 30 kg ha<sup>-1</sup>, 6 autres cases reçoivent une fertilisation de 80 kg ha<sup>-1</sup> tandis que les 3 dernières (qui constitueront le traitement ON) ne reçoivent aucune dose d'azote. Le 31 mars 2017, un deuxième apport de 30 ou 80 kg de N ha<sup>-1</sup> est réalisé sur les cases précédemment fertilisées en N de manière à obtenir une fertilisation finale de 60 (60N) et 160 (160N) kg de N ha<sup>-1</sup>. Les plantes de la moitié des cases 60N et 160N reçoivent un apport fractionné de Si (4 apports: 1 kg ha<sup>-1</sup> au stade C1, 1 kg ha<sup>-1</sup> au stade E et deux apports de 5 kg ha<sup>-1</sup> au stade F) sous forme de Si(OH)<sub>4</sub> afin d'obtenir une dose finale de 12 Kg ha<sup>-1</sup> de Si (60N+Si et 160N+Si). Pour chaque case, la moitié des plantes (soit une surface de 1 m<sup>2</sup>) est récoltée au stade « Floraison; T1: 16 mai 2017) alors l'autre moitié est récoltée au stade « graines matures; T2: 07 Juillet 2017).

La moitié des cases 60N et 160 N reçoivent un apport fractionné de Si (4 apports: 1 kg ha<sup>-1</sup> au stade C1, 1 kg ha<sup>-1</sup> au stade E et deux apports de 5 kg ha<sup>-1</sup> au stade F; **Figure II.5**) sous forme de Si(OH)<sub>4</sub> afin d'obtenir une dose finale de 12 Kg ha<sup>-1</sup> de Si (60N+Si et 160N+Si).

Pour chaque case, la moitié des plantes (soit une surface de 1 m<sup>2</sup>) est récoltée au stade « Floraison; T1 : 16 mai 2017) alors que l'autre moitié est récoltée au stade « graines matures; T2 : 07 Juillet 2017).

## **II. Analyses physiologiques, élémentaires et biochimiques**

### **II.1. Mesure de l'activité photosynthétique et estimation de la teneur en chlorophylles (Articles 1 et 3)**

Dans le cadre de l'expérimentation décrite dans l'article 1 (section § III.I.1), la feuille mature de chaque plante a été repérée juste avant l'apport de Si. Une estimation de sa teneur en chlorophylles ainsi que son activité photosynthétique ont été mesurées quotidiennement chez les plantes témoins (-Si+N; -Si-N) et les plantes traitées au Si (+Si+N; +Si-N).

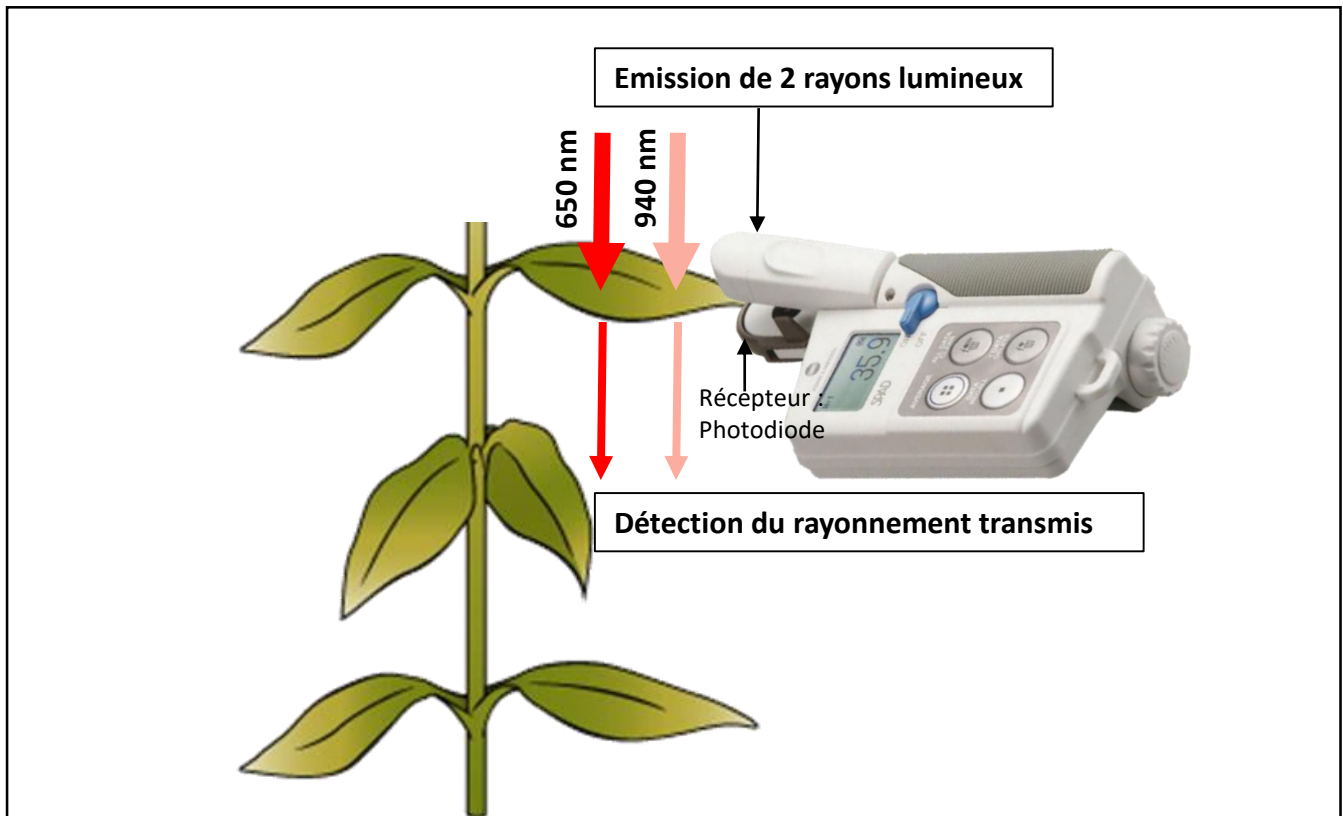
#### **II.1.1. Estimation de la teneur en chlorophylles (Articles 1 et 3)**

La teneur en chlorophylles des feuilles matures est estimée à l'aide d'une pince SPAD «Soil Plant Analysis Development» (SPAD modèle 502, Minolta, Japon). Cet appareil est pourvu d'une fenêtre émettant des radiations rouges (650 nm) et infrarouges (940 nm) (**Figure II.6**) qui traversent la feuille et sont ensuite captées par un récepteur qui les convertit en signal analogique puis numérique. Le rapport entre les intensités des radiations rouges (650nm, spécifiques de des chlorophylles) et infrarouges (faiblement absorbées par les chlorophylles) permet d'estimer les teneurs en chlorophylles (exprimées en unité arbitraire ou unité SPAD; **Figure II.6**). Plus la valeur indiquée est élevée, plus la teneur en chlorophylles est élevée.

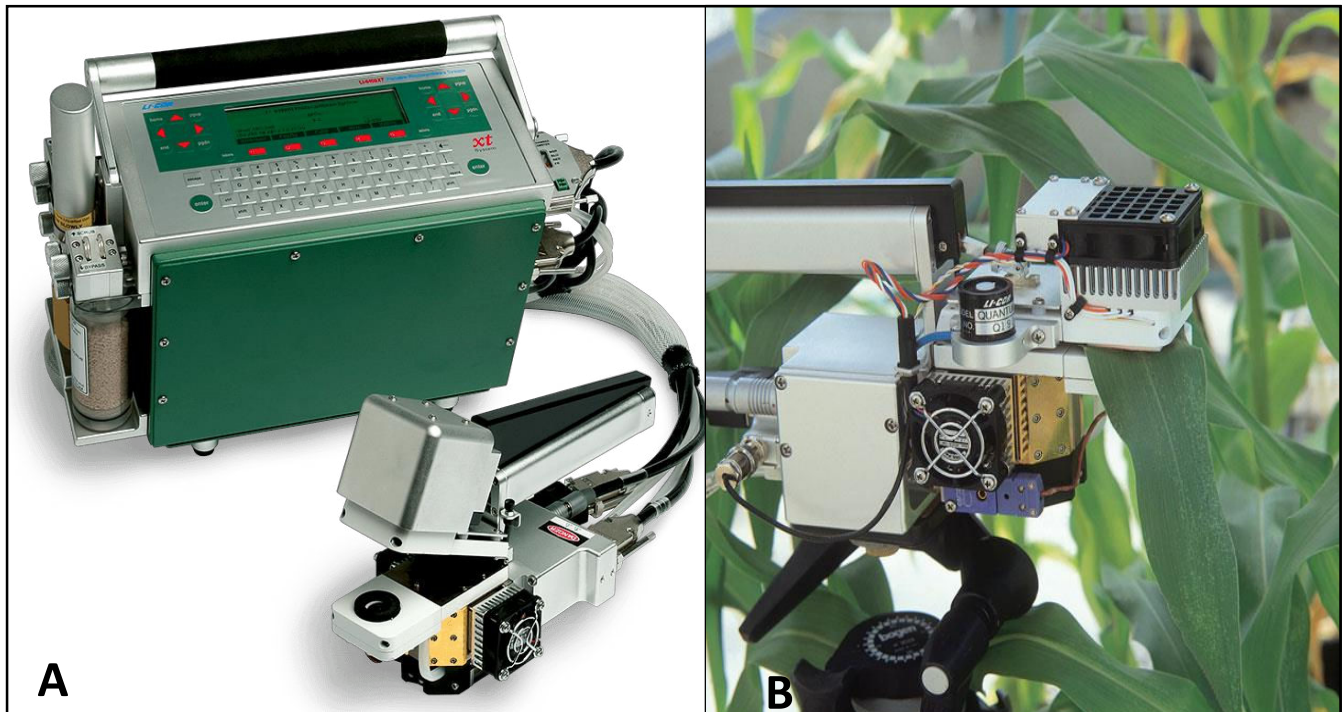
Les teneurs en chlorophylles ont été mesurées quotidiennement sur 6 plantes de chaque traitement et pour chaque répétition biologique, 10 mesures ont été réalisées à des endroits différents du limbe.

#### **II.1.2. Mesure de l'activité photosynthétique (Articles 1 et 3)**

Les mesures de l'activité photosynthétique des feuilles matures sont mesurées quotidiennement entre 9h00 et 10h00 à l'aide d'un système de mesures d'échanges gazeux portatif LI-6400 (LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA; **Figure II.7**). Cet appareil de mesure est



**Figure II.6: principe de mesure des teneurs relatives en chlorophylles à l'aide du SPAD modèle 502 (Minolta, Japon).** Deux faisceaux (rouge et infrarouge) sont émis par la pince qui enserre le limbe. Les faisceaux traversent la feuille et sont captés par la cellule réceptrice, l'énergie photonique est alors convertie en signal numérique. Le rapport des intensités lumineuses (rouge et infrarouge) permet de définir une teneur relative en chlorophylles exprimée en unité SPAD (unité arbitraire). Plus la valeur indiquée est élevée, plus la teneur en chlorophylles est élevée.



**Figure II.7: Appareil de mesure de l'activité photosynthétique LICOR (LI-6400 (LICOR, Lincoln, Nabraska, USA).** Le LICOR est piloté par une interface logicielle mesurant et enregistrant la transpiration, la conductance et la photosynthèse sur une surface foliaire. Il est constitué d'une console assurant la gestion des données et le pilotage de l'appareil (A) ainsi que d'une chambre de mesure (B) où sont mesurés les flux gazeux et l'humidité au contact de la partie de la feuille séquestrée. Les mesures sont effectuées à l'aide de deux analyseurs de gaz (IRGA: Infra Red Gas Analyser) l'un mesurant l'air de référence extérieur, et l'autre l'air de la chambre où se trouve l'échantillon.

constitué d'une pince qui enregistre des variations de teneurs en CO<sub>2</sub> et en H<sub>2</sub>O sur une surface foliaire de 6 cm<sup>2</sup>. L'ensemble des mesures est réalisé à une température de 20°C, sous une atmosphère de 400 ppm de CO<sub>2</sub> et un PAR (Photosynthetic Active Radiations) de 400 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (**Figure II.7**). Pour chaque traitement, des mesures sont effectuées sur 6 plantes et 3 mesures sont réalisées à des endroits différents du limbe.

## II.2. Analyses élémentaires

Toutes les analyses élémentaires menées dans le cadre de ces travaux de thèse ont été effectuées sur la plateforme d'isotopie de Normandie (PLATIN') de la SFR ICORE de l'université de Caen Normandie.

### II.2.1. Analyse de l'azote total par spectrométrie de masses isotopiques (IRMS) (Articles 1 et 2)

L'analyse de l'azote total est réalisée à l'aide dans un analyseur élémentaire C/N/S (EA3000, Euro Vector, Milan, Italie) couplé à un spectromètre de masse de mesures de ratio isotopique (IRMS; **Figure II.8**). Ces analyses ont été réalisées sur la plateforme d'isotopie de Normandie (PLATIN') de la SFR ICORE de l'université de Caen Normandie

Les échantillons lyophilisés et finement broyés sont pesés précisément dans une capsule en aluminium de façon à analyser entre 80 et 100 μg d'azote. Chaque échantillon est injecté dans une colonne de combustion en présence d'un flux constant d'hélium afin d'éviter une contamination par le dioxyde de carbone et l'azote de l'air (**Figure II.8**). Les échantillons subissent ensuite une combustion totale afin de passer à l'état gazeux (N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O et oxyde d'azote), grâce à une élévation de température (1030°C) assurée par un apport d'oxygène en tête de la colonne d'oxydation constitué d'oxyde de chromium et de cobalt. Les échantillons sous forme gazeuse sont réduits (réduction des gaz en N<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>) suite à leur passage dans une colonne de cuivre métallique chauffée à 650°C. Après piégeage de l'H<sub>2</sub>O dans une colonne contenant du perchlorate de magnésium et du carbosorb®, le N<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub> sont séparés sur une colonne de chromatographie en phase gazeuse à 45°C avant d'être injectés dans le spectromètre de masse où ils sont dans un premier temps ionisés (**Figure II.8**). Dans un deuxième temps, les ions moléculaires positifs ainsi formés sont accélérés dans un champ électrique puis déviés par un champ magnétique, leur angle de déviation étant directement affecté par le rapport de leur masse (m) sur leur charge (z). Toutes les molécules de N<sub>2</sub> ionisées

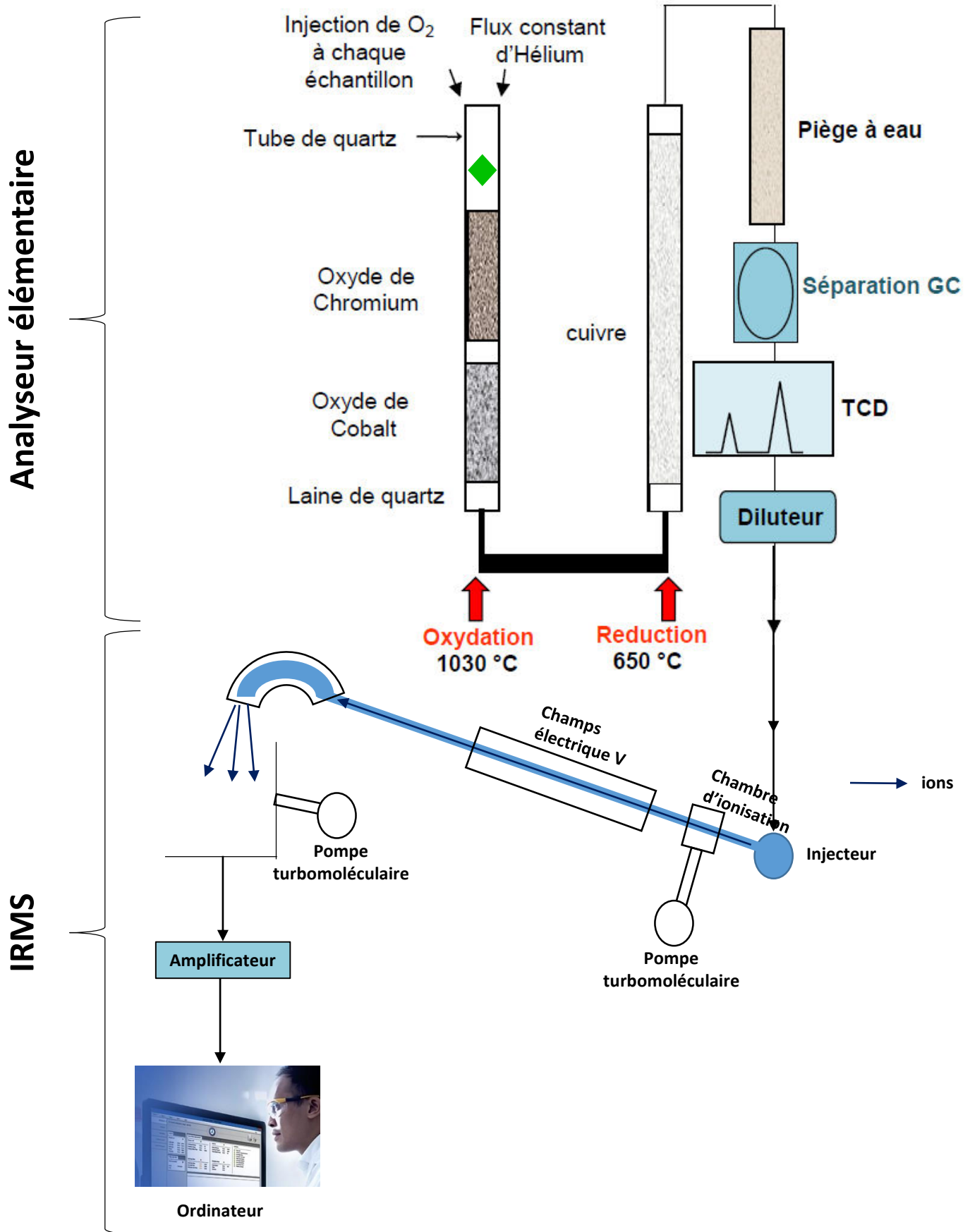


Figure II.8: Analyseur élémentaire C/N/S (EA3000, Eurovector) couplé au spectromètre de masse de ratio isotopique (IRMS, Isotope Mass Spectrometer, Isoprime GV Instrument) utilisé pour déterminer les teneurs en azote des échantillons . GC: Gas Chromatography (chromatographie en phase gazeuse); TCD: Thermal Conductivity Detector (détecteur à conductibilité thermique).

étant de même charge, leur angle de déviation est donc uniquement dépendant de leur masse. Ainsi, la déviation de l'azote moléculaire de masse 28 ( $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ ) sera plus importante que celle de l'azote de masse 29 ( $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ ), elle-même plus importante que celle de l'azote de masse 30 ( $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$ ). Les ions sont ensuite collectés par trois détecteurs et les signaux qui en résultent sont ensuite amplifiés puis transmis à un système informatique (**Figure II.8**).

La quantification de l'azote est réalisée en faisant la somme des signaux obtenus à partir des masses 28 ( $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ ), 29 ( $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ ) et 30 ( $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$ ). L'analyseur IRMS fournit directement le pourcentage d'azote (% N) et la quantité de N total (Qt N) dans un tissu donné est calculée comme suit :

$$Qt\ N = (\%N * MS)/100 \text{ où } MS = \text{matière sèche de l'échantillon}$$

### II.2.2. Analyses multi-élémentaires par spectrométrie de masse haute résolution à plasma à couplage inductif (ICP-MS-HR) (Article 2)

Les macroéléments (Na, Mg, P, S, Ca et K) et les microéléments (Mo, Cd, Pb, B, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn et Se) sont analysés par ICP-MS-HR à partir de 40 mg de matière sèche. Les échantillons préalablement broyés sont minéralisés par l'action d'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) et d'un agent oxydant ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) avant d'être analysés à l'ICP-MS-HR. Pour ce faire, 900  $\mu\text{l}$  d'eau ultra pure et 1 ml de solution composée d'un mélange de  $\text{HNO}_3$  :  $\text{H}_2\text{O}_2$  (soit 800  $\mu\text{l}$  de  $\text{HNO}_3$  (qualité Optima Grade (Fisher)) + 200  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Qualité PlasmaPURE plus 30-32 % (SCP Science)) sont ajoutés au 40 mg de MS contenus dans un tube en téflon de 50 ml (**Figure II.9A**). 100  $\mu\text{l}$  de solution de standards internes sont ensuite ajoutés (Gallium : 10 ppm; Rhodium : 3 ppm; Iridium : 2 ppm). Les tubes en téflon sont ensuite fermés puis placés dans un rotor HVT50 T16 avant d'être mis au four à micro-ondes pour un cycle de minéralisation qui comprend 4 étapes et dure 47 minutes (**Figure II.9.B**) : 5 minutes d'augmentation de température pour atteindre 130°C, 2 minutes à 130 °C, 5 minutes d'augmentation de température pour atteindre 190 °C et 35 minutes à 190°C (**Figure II.10**). Les tubes sont ensuite refroidis pendant une vingtaine de minutes. Les échantillons minéralisés sont repris dans 50 ml d'eau ultra pure puis filtrés à l'aide d'un filtre téflon de 0,45  $\mu\text{m}$  avant d'être analysés par ICP-MS-HR.

Les analyses élémentaires sont effectuées à l'aide d'un ICP-MS HR Element2 (Thermo Fisher Scientific, France). L'échantillon liquide est prélevé par une aiguille pour être acheminé



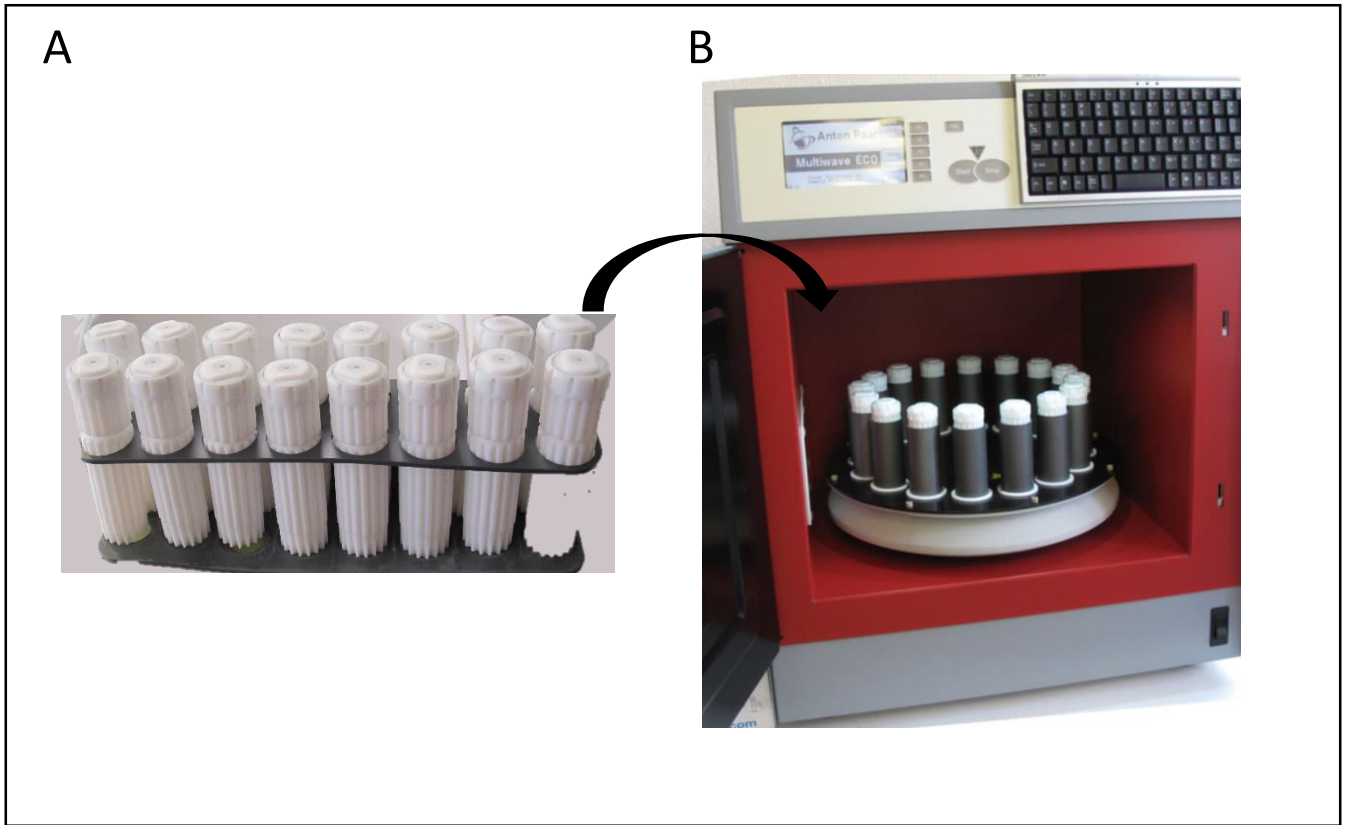


Figure II.9: Dispositif de minéralisation acide des échantillons dans un four à micro-onde.

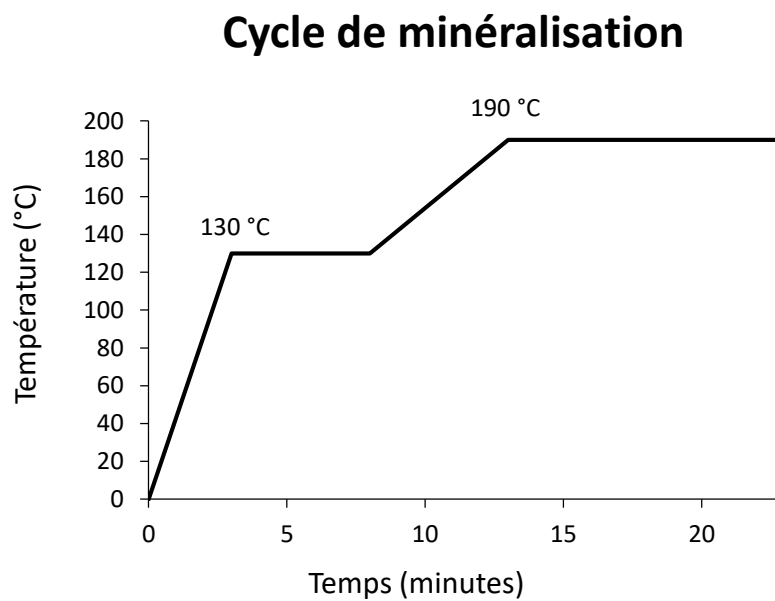


Figure II.10: Cycle de minéralisation au micro-ondes (Multiwave ECO, Anton Paar, les Ulis, France) suivi pour la digestion des échantillons avant analyses ICP-MS-HR.

jusqu'à la chambre de nébulisation cyclonique où il est nébulisé en fines gouttelettes (**Figure II.11**). Le gaz vecteur (argon) entraîne environ 6 µl de l'échantillon dans la torche à plasma qui ionise l'échantillon. Une fois ionisé, les ions subissent une accélération électrique et transitent *via* une optique de transfert vers un champ magnétique où ils sont séparés en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ) (**Figure II.11**). Avant d'arriver au détecteur, les ions traversent un champ électrique qui élimine les ions de trop faible énergie cinétique. Après ce double filtrage, chaque ion arrive sur un détecteur qui mesure un nombre de coups par seconde, celui-ci étant proportionnel à la teneur de l'élément dans l'échantillon végétal. Le signal est ensuite intégré par une interface informatique qui donne les résultats directement en parties par million (ppm : µg g<sup>-1</sup> de MS) (**Figure II.11**).

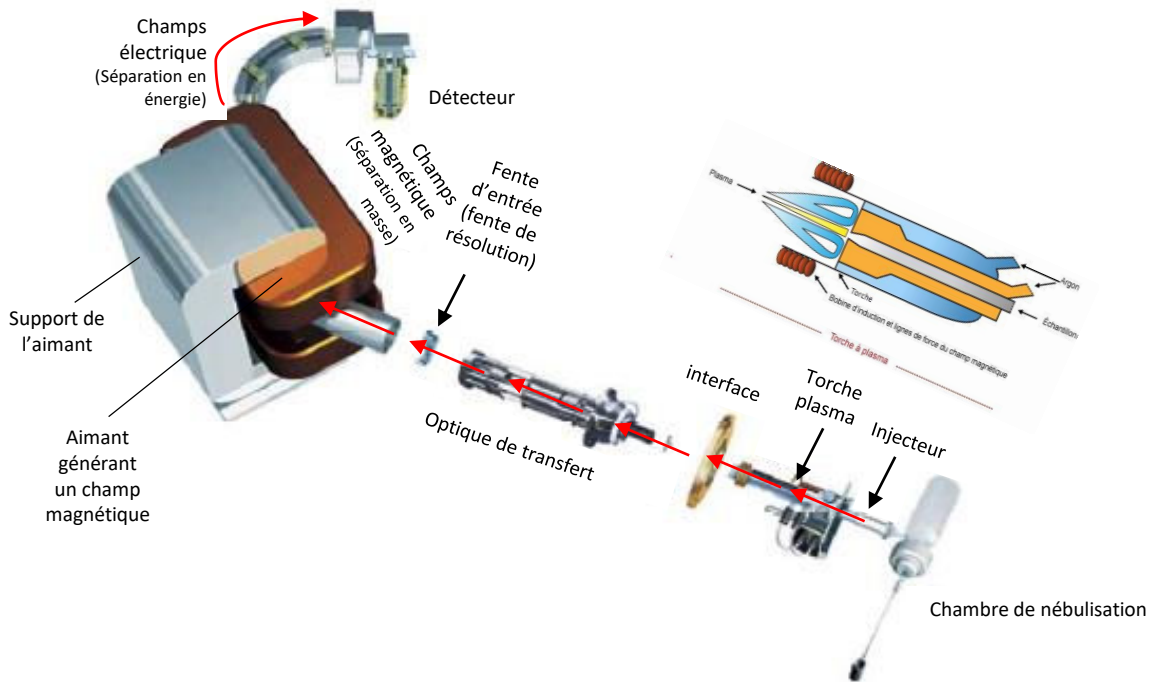
Concernant le Si, des essais de quantification par cette méthode ont été réalisés mais n'ont pas donné de résultats satisfaisants notamment du fait que le Si est piégé par des particules d'aluminium au cours de l'étape de préparation des échantillons, ce qui conduit à une importante sous-estimation des teneurs en Si *in planta*. De ce fait, une méthode colorimétrique a été mise au point pour doser cet élément.

### II.2.3. Dosage du Silicium (Si) par colorimétrie (Article 1)

La méthode de dosage de Si a été adaptée à partir de la méthode décrite par **Dai et al. (2005)**.

Le Si absorbé par les plantes étant principalement accumulé sous forme amorphe au niveau pariétal, il est nécessaire de procéder à une minéralisation afin de doser l'ensemble du Si contenu dans la plante. Dans la littérature, il existe plusieurs méthodes de minéralisation du Si, comme par exemple, la minéralisation acide (**Nayar et al., 1975**) nécessitant l'utilisation d'acides forts tels que l'acide perchlorique (HClO<sub>4</sub>), l'acide nitrique (HNO<sub>3</sub>) ou l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ou encore *via* l'utilisation combinée d'un acide faible, l'acide fluorhydrique (HF) et d'un acide fort, l'acide chlorhydrique (HCl; **Saito et al., 2005**). L'utilisation de ces méthodes est particulièrement délicate du fait de la présence d'acides forts ou d'acide fluorhydrique, extrêmement toxique.

D'autres études rapportent que le Si peut aussi être minéralisé en présence de produits chimiques fortement alcalins tels que le carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) et l'hydroxyde de sodium (NaOH). Cette méthode exige l'utilisation de creusets en platine très onéreux pour



**Figure II.11: Trajet des ions en ICP-MS-HR** (Element 2, Thermo Fisher, France). Les flèches rouges représentent le trajet suivi par l'échantillon qui est dispersé en fin aérosol suite à sa collision avec le flux d'argon dans la chambre de nébulisation. L'échantillon est ensuite introduit dans la torche plasma où il est ionisé avant de traverser l'interface qui va permettre le transfert des ions vers le spectromètre de masse. À la sortie de l'interface, les ions sont envoyés dans un champ magnétique où ils seront séparés en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ) avant de traverser un champ électrique qui éliminera les ions de trop faible énergie cinétique. Pour chaque ion, le détecteur mesure les impulsions électriques générées (en coups par seconde) et le signal est ensuite intégré par une interface informatique qui donne la teneur exprimée en partie par million (ppm:  $\mu\text{g g}^{-1}$  MS).

travailler à des très hautes températures (1000 °C dans un four à moufle). Par ailleurs, elle nécessite l'utilisation d'acides forts (HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pour reprendre le minéralisât obtenu (Liang et al., 2015). Enfin, une dernière méthode de minéralisation par autoclave (Autoclave-Induced Digestion : AID) en présence de NaOH, décrite par Dai et al. (2005) a été retenue de par ses caractères peu dangereux et peu coûteux. Ainsi, après lyophilisation et broyage, à 100 mg de MS sont ajoutés 3 ml de NaOH (50% v/v). Le mélange est vortexé avant d'être autoclavé à 121°C pendant 20 minutes et le volume est ajusté à 10 ml avec de l'eau ultra pure. Ces solutions sont ensuite dosées par la méthode colorimétrique au bleu de silico-molybdate (Hallmark et al., 1982; Dai et al., 2005) : 160 µl d'échantillon sont ajoutés à 1200 µl d'acide acétique (20% v/v). 400 µl de molybdate d'ammonium (43,7 mM; pH 7) sont ensuite ajoutés à ce mélange qui après homogénéisation est laissé à température ambiante pendant 5 minutes pour favoriser la formation de complexes silico-molybdates. 200 µl d'acide tartrique (20%) sont ensuite ajoutés afin de minimiser les interférences avec le phosphore (P) via la formation de complexes phospho-molybdate. 40 µl de solution réductrice (2 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> et 0,4 g d'acide 1-amino-2-naphtol-4-sulfonique, 25 g de NaHSO<sub>3</sub> dissouts et ajustés à 250 ml avec de l'eau ultra pure) sont ajoutés pour permettre la réduction du complexe silico-molybdate (apparition d'une coloration bleue). Après 30 minutes, l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 650 nm et les concentrations en Si sont déterminées en se référant à une droite d'étalonnage dont les concentrations sont comprises entre 0 et 100 mg L<sup>-1</sup> (Figure II.12).

Cette méthode de dosage du Si a été validée au laboratoire grâce à l'utilisation d'un standard de référence certifié : une poudre de feuilles de citronnier (CRM NCS ZC73018 : Citrus Leaves - Sylab) dont la teneur en Si (0,4 %) correspond à une moyenne des teneurs obtenues par six laboratoires internationaux indépendants.

### **II.3. Analyses biochimiques**

#### **II.3.1. Détermination des teneurs en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Article 1)**

Le dosage de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dans les tissus végétaux est effectué en suivant la méthode décrite par Yu et al. (2003). 200 mg de MF sont repris dans 3 ml de tampon phosphate (50 mM; pH 6,5; 4°C). Le mélange est ensuite centrifugé (11500 g; 4°C) pendant 15 minutes puis 1 ml de TiCl<sub>4</sub> (0.1% dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% (v/v)) est ajouté au surnageant (3 ml) avant centrifugation (11500 g) à température ambiante pendant 15 minutes. L'absorbance du

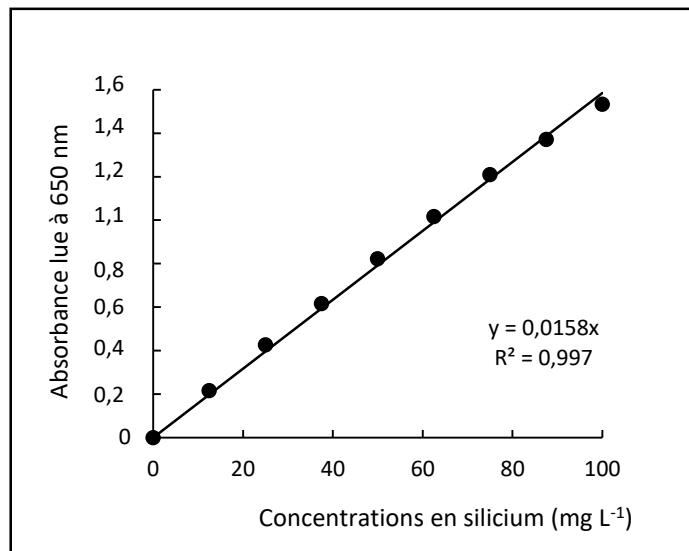


Figure II.12: Droite d'étalonnage du dosage du silicium réalisée à partir de solutions standard de SiO<sub>2</sub>.



Figure II.13: Système UHPLC-MS/MS utilisé pour le dosage des phytohormones. Ce système est constitué d'une chromatographie liquide ultra haute pression (UHPLC, Nexera X2 UHPLC system, Shimadzu, Japan) couplé à un spectromètre de masse QTrap 6500+ (Sciex, Canada) équipé d'une source électrospray (ESI: Electro Spray Ionisation).

nouveau surnageant est mesurée à 410 nm et les concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (exprimées en μmol g<sup>-1</sup> MF) sont calculées en utilisant le coefficient d'extinction molaire de ce composé:  $\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2} = 0,28 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

### II.3.2. Détermination des teneurs en malondialdéhyde (MDA) (Article 1)

Les teneurs en malondialdéhyde (MDA) dans les tissus végétaux sont déterminées en utilisant la méthode à l'acide thiobarbiturique (TBA) décrite par **Hasanuzzaman et al. (2011)**. A 200 mg de MF sont ajoutés 4 ml d'acide thiochloroacétique (TCA; 5%) et le mélange est ensuite centrifugé à 5000 g pendant 30 minutes. Le surnageant (1 ml) est récupéré puis mélangé avec 4 ml de TBA (0,5% de TBA dans 20% de TCA). Le mélange réactionnel est chauffé au bain-marie à 95°C pendant 30 minutes puis rapidement refroidi sur la glace. L'absorbance est ensuite mesurée à 532 et 600 nm. La concentration de MDA, exprimée en nmol g<sup>-1</sup> MF, est déterminée en effectuant la différence d'absorbances ( $A_{532} - A_{600}$ ) et en utilisant le coefficient d'extinction du MDA :  $\epsilon_{\text{MDA}} = 155 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

### II.3.3. Détermination des teneurs en cytokinines (Article 1)

Les cytokinines ont été analysées au CMI de Saint Malo (Groupe Roullier) par chromatographie liquide ultra haute pression (UHPLC) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) (**Figure II.13**).

Les cytokinines sont extraites à partir de 10 mg de matière fraîche préalablement broyées en présence d'azote liquide et auxquels est ajouté 1 ml de solution MeOH/H<sub>2</sub>O/acide formique (70%/29%/1%, v/v/v) contenant des étalons internes (0,2 ng/ml) marqués au deutérium ([<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-SA, [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-JA, [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ABA, [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-JA-ILE, [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-GA4, [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-1-aminocyclopropane carboxylic acid (D-ACC), [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Dihydrozeatin, [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Dihydrozeatin riboside, [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-N6-Isopentenyladenine, [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-N6-Isopentenyladenosine, [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-trans-zeatin, Dihydrophaseic acid (DPA), phaseic acid (PA), [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-dihydrophaseic acid (D-DPA), and [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-phaseic acid (D-PA)). Le mélange est ensuite agité pendant 30 minutes à température ambiante puis centrifugé pendant 20 minutes (16000 rpm ; 4°C). Le surnageant est récupéré puis évaporé à sec sous azote en utilisant un système Turbovap LV (Biotage, Suède). Les extraits secs sont ensuite dissouts dans 2 ml d'acide formique à 2% (v/v) avant purification sur colonne (SPE : solid-phase extraction; Evolute express ABN 3mL-60 mg; Biotage, UK). L'élution des cytokines est réalisée par ajout de 2 ml



d'une solution MeOH/NH<sub>4</sub>OH (95%/5%, v/v). L'éluat est évaporé à sec et repris dans 100 µl d'eau ultra pure contenant 0,1% d'acide formique.

L'analyse des cytokinines est réalisée en utilisant un système Nexera X2 UHPLC (Shimadzu, Japan) couplé à un spectromètre de masse QTrap 6500+ (Sciex, Canada) équipé d'une source électrospray (ESI : Electro Spray Ionisation) : 2 µl d'échantillon sont injectés dans une colonne core-shell Kinetex Evo C18 (100 x 2,1mm, 2,6µm, Phenomenex, USA). Les phases mobiles (débit 0,7 ml min<sup>-1</sup>) sont composées d'un solvant A contenant 0,1% (v/v) d'acide formique (LCMS, Fluka analytics, Allemagne) et d'un solvant B contenant de l'acétonitrile (Fisher Optima, Angleterre) et 0,1% (v/v) d'acide formique. Le gradient des deux solvants utilisé est le suivant : 98% de solvant A et 2% de solvant B de 0 à 3 min, 80% de solvant A et 20% de solvant B de 3 à 4 min, 75% de solvant A et 25% de solvant B de 4 à 4 min 30 et 100% de solvant B de 4 min 30 à 6 min. Les échantillons élués de la colonne sont ensuite ionisés par la source ESI (5 KV) produisant des ions positifs. Chaque composé est ensuite quantifié en utilisant le logiciel MultiQuant V 3.0.2 (Sciex, Canada).

#### **II.3.4. Détermination des teneurs en huile, en protéines et en glucosinolates des graines par analyses NIRS (Near InfraRed Spectroscopy)**

Les graines issues de l'expérimentation de l'article 2 ont été analysées à l'UMR INRA IGEP de Rennes à l'aide d'un spectromètre portatif proche infrarouge monochromator (NIRSystem model 6500, FOSS NIRSystem Inc, Silver Spring, MD) en mode réflectance. Les mesures ont été obtenues à partir d'un scan réalisé sur environ 5 g de graines sèches. Les résultats sont calculés à l'aide une courbe de calibration externe établie pour les teneurs en huile, en glucosinolates et en protéines dans les graines de colza (équation commercialisée par CRAW, Gembloux, Belgique). Trois répétitions techniques sont effectuées pour chaque échantillon (3 répétitions biologiques) et les teneurs en huiles, en protéines et en glucosinolates sont exprimées en fonction de la matière sèche des graines. Par ailleurs, le rapport  $\omega_6/\omega_3$  est déterminé à partir des teneurs en acides linoléique ( $\omega_6$ ) et linoléique ( $\omega_3$ ).

#### **II.4. Analyses moléculaires**

##### **II.4.1. Extraction des ARN<sub>total</sub> et analyses de l'expression des gènes par PCR (Articles 1 et 3)**

Les ARN<sub>total</sub> sont extraits à partir de 200 mg de matière fraîche (feuilles matures et racines) préalablement broyés dans l'azote liquide auxquels sont ajoutés 750 µl de tampon



**Tableau II.2: Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour l'amplification en Q-PCR.** A: Adénine, T: Thymine, G: Guanine, C: Cytosine.

Gène	Séquences nucléotidiques des amorces	n° d'accèsion du gène
<i>EF1-α</i>	Sens 5'-TTTCGAGGGTGACAACATGA-3'	XM_013854440.2
	Anti-sens 5'-CCGTTCCAATACCACCAATC-3'	
<i>18 S</i>	Sens 5'-CGGATAACCGTAGTAATTCTAG-3'	KX709373.1
	Anti-sens 5'-GTACTCATTCCAATTACCAGAC-3'	
<i>BnaNRT1.1</i>	Sens 5'-ATGGTAACCGAAGTGCCTTG-3'	AJ293028.1
	Anti-sens 5'-TGATTCCAGCTGTTGAAGC-3'	
<i>BnaNRT2.1</i>	Sens 5'-TGGTGAATAGGCGGCTCGAGTTG-3'	AJ278966.1
	Anti-sens 5'-GTATACGTTTTGGGTCATTGCCAT-3'	
<i>BnaAMT1.1</i>	Sens 5'-GTCCTTGACGCTGCAGCCGGTG-3'	AF188744.1
	Anti-sens 5'-CGGGCTGGCCCATCCATCAAC-3'	
<i>BnaNL</i>	Sens 5'-ATAACGACCGCAGATTTTGG-3'	XM_013862524.2
	Anti-sens 5'-AGCTACGCCCGTAACAGCTA-3'	
<i>BnaChit</i>	Sens 5'-GGATGTGCGAGTTTCATGTG-3'	XM_013835916.2
	Anti-sens 5'-TGATGAAAGCCTGACGAGTG-3'	
<i>BnaMon</i>	Sens 5'-TGCAGTTTTGTCTGGACGAG-3'	XM_013788930.2
	Anti-sens 5'-CGCGTAATTTTCAGGGTTA-3'	
<i>BnaPI</i>	Sens 5'-GTCCTGGGAAGAACTCATGG-3'	XM_013843966.2
	Anti-sens 5'-GGTAGGACTCTGACGACGA-3'	

d'extraction (LiCl 100 mM, Tris base 100 mM, EDTA 10 mM et SDS 1%, pH 8) et 750 µl de phénol chaud (pH 4; 80°C). Le mélange est vortexé pendant 40 secondes avant d'ajouter 750 µl de chloroforme/alcool isoalylique (24/1, v/v). Après homogénéisation, le mélange est centrifugé pendant 5 minutes (12000 g; 4°C). Le surnageant est ensuite récupéré et les acides nucléiques sont précipités toute la nuit (4°C) par ajout de 750 µL de LiCl (4 M). Le lendemain, le mélange est centrifugé à 4°C pendant 20 minutes (12000 g) puis le surnageant est éliminé. Le culot contenant les acides nucléiques est repris dans 100 µl d'eau ultra pure. Les ARN sont ensuite purifiés (dessalage et traitement DNase) à l'aide du Kit Qiagen RNeasy Mini Kit en suivant le protocole préconisé par le fournisseur (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Les ARN totaux sont dosés par spectrophotométrie UV à 260 nm (et à 280 nm) sachant qu'une unité d'absorbance correspond à 40 µg ml<sup>-1</sup> d'ARN<sub>totaux</sub>. La pureté des ARN<sub>totaux</sub> est vérifiée grâce au rapport des absorbances A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> dont la valeur doit être proche de 2. La qualité des ARN extraits a été contrôlée en déposant 1 µg d'ARN (dénaturé 9 minutes à 70°C puis 10 min à 4°C) sur un gel d'agarose (1%) en présence d'un tampon de charge (0,025 % de bleu de bromophénol (w/v), 0,025 % de xylène cyanol (w/v), 3 % de glycérol (v/v), 2,5 µL de bromure d'éthidium (BET à 10 mg/ml), 100 µl de MOPS X10, 615 µl de formamide désionisé et 188 µl de formaldéhyde).

Pour la reverse transcription, à 1 µg d'ARN sont ajoutés 2 µl de Mix Iscript 5X (Bio-Rad Courtaboeuf, France) et 0,5 µl d'enzyme Reverse transcriptase Iscript, qsp H<sub>2</sub>O 10µl. Le mélange est incubé pendant 5 minutes à 25°C puis 30 minutes à 42°C (synthèse du brin d'ADNc) et 5 minutes à 85°C pour stopper la réaction. Les échantillons sont conservés à -20°C avant analyses par PCR semi-quantitative (Indicateurs *SAG12/Cab*) ou Q-PCR.

Analyse de l'expression relative des gènes par Q-PCR : Pour chaque gène d'intérêt (ou gène cible dont on souhaite quantifier l'expression), des amorces (sens et anti-sens) ont été validées au laboratoire, les séquences nucléotidiques de ces amorces sont représentées dans le **tableau II.2**. Chaque réaction de Q-PCR est réalisée en mélangeant 4 µl d'ADNc (dilués 200 fois) et 11 µl de Mix réactionnel composé de : 500 nM d'amorces (sens et anti-sens spécifiques de chaque gène, cf **Tableau II.2**) et de 1X tampon SYBER Green PCR Master Mix (Bio-Rad, Courtaboeuf, France). Le mélange est ensuite incubé dans un thermocycleur CFX 96 puits (Bio-Rad, Courtaboeuf, France). La Taq polymérase utilisée étant de type « Hot Start », la PCR commence par une étape de chauffage de 3 minutes à 95°C pour rompre la liaison entre

**Tableau II.3: Séquences nucléotidiques des amorces utilisées en PCR semi-quantitative pour amplifier les gènes *EF1- $\alpha$* , *BnaSAG12* et *Cab*.**

Gène	Séquences nucléotidiques des amorces	n° d'accèsion des gènes
<i>EF1-<math>\alpha</math></i>	Sens 5'-TTTCGAGGGTGACAACATGA-3'	XM_013854440.2
	Anti-sens 5'-CCGTTCCAATACCACCAATC-3'	
<i>BnaSAG12</i>	Sens 5'-GGCAGTGGCACACCAMCCGGTTAG-3'	XM_022696851.1
	Anti-sens 5'-AGAAGCMTTCATGGCAAGACCAC-3'	
<i>Cab</i>	Sens 5'-GGCAGCCCATGGTACGGATC-3'	XM_013836544.2
	Anti-sens 5'-CCTCCTTCGCTGAAGATCTGT-3'	

l'enzyme et l'anticorps et permettre à la Taq polymérase d'être active. Un programme de 40 cycles (comprenant deux étapes, une étape de dénaturation de 10 secondes à 95°C et une étape d'hybridation et d'élongation de 40 secondes à 60°C) est ensuite réalisé. Pour chaque échantillon, des réactions de Q-PCR sont également réalisées pour amplifier 2 gènes de références dont l'expression n'est pas affectée par les conditions expérimentales : *EF1-α* et *ARN18S (18S)*. Pour chaque condition expérimentale, les réactions de QPCR sont réalisées sur 3 répétitions biologiques.

Pour chaque réaction Q-PCR, les cycles seuils ou Ct (Cycle treshold) des gènes d'intérêt et de références sont déterminés afin de calculer l'expression de relative des gènes d'intérêts. Cette quantification relative est basée sur la méthode des « Deltadelta de Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) » en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Expression relative} = 2^{-[\Delta\Delta Ct]}$$

Le  $\Delta\Delta Ct$  est calculé comme suite :

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{échantillon traité}} - \Delta Ct_{\text{échantillon témoin}}$$

Avec

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gène étudié}} - Ct_{\text{gènes de références}}$$

Le Ct des gènes de référence (*EF1-α* et *18S*) représente la moyenne géométrique des Ct obtenus pour ces deux gènes. L'expression relative du chaque gène d'intérêt de l'échantillon traité est calculé relativement à l'expression du même gène dans l'échantillon témoin qui est, par définition, est égale à  $2^0$ , c'est-à-dire 1 (**Livak et Schmittgen, 2001**).

Analyse de l'expression des gènes par PCR semi-quantitative : La PCR semi-quantitative a été utilisée seulement pour la quantification des deux gènes utilisés comme indicateur spatio-temporel de sénescence comme décrit par **Gombert et al. (2006)** et dont le détail est donné dans le chapitre I §1.3.C.2. Les réactions de PCR semi-quantitatives sont réalisées à partir de 50 ng d'ADNc (1  $\mu$ l) dans un volume final de 11  $\mu$ l en présence d'un mélange réactionnel contenant : un tampon avec  $MgCl_2$  10X (Tris Hcl 10 mM, KCl 50 mM,  $MgCl_2$  1,5 mM, triton X100 à 1% et de la BSA 0,2 mg  $ml^{-1}$ ), 0,5 M de Taq polymérase (5 U  $\mu$ l<sup>-1</sup> : QBIogen), 250  $\mu$ M de dNTPs et 0,65  $\mu$ M d'amorces sens et anti-sens (*EF1-α*, *BnaSAG12* et *Cab*; **Tableau II.3**). Le mélange a été ensuite incubé dans un thermocycleur GenAmp PCR System 2700 (Applied

**Tableau II.4: Programme utilisé en PCR semi-quantitative (thermocycleur GenAmp 2700, Applied Biosystems).**

Etape	Température	Durée	
Dénaturation et activation de la Taq Polymérase	95 °C	5 minutes	/
Dénaturation	95 °C	30 secondes	X Cycles
Hybridation des amorces	Tm des amorces = 58 °C	30 secondes	
Elongation	72 °C	1 minute	
Fin d'élongation des transcrits	72 °C	10 minutes	/
Arrêt de la réaction et conservation des amplicons	4 °C	∞	/

Biosystems, Levallois-Perret, France). Après une étape de chauffage à 95°C pendant 5 minutes (Dénaturation de l'ADN et activation de l'enzyme «hot start », les réactions de PCR sont effectuées en réalisant X cycles comprenant les étapes suivantes (**Tableau II.4**) : une étape de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, une étape d'hybridation des amorces à 58°C pendant 30 secondes, une étape d'élongation à 72 °C pendant une minute. Pour chaque couple d'amorces, le nombre de cycles « X » est optimisé afin d'éviter une saturation du signal en fin de réaction : X est égal à 26 pour le gène *EF1- $\alpha$*  et à 22 pour les gènes *BnaSAG12* et *Cab*. Les produits d'amplification sont séparés sur gel d'agarose 1,2% en présence de bromure d'éthidium (0,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Le gène *EF1- $\alpha$*  est un gène de référence utilisé pour contrôler les étapes de RT et de PCR et également pour la normalisation des quantités de transcrits des gènes d'intérêts. Les produits d'amplification de chaque gène (*SAG12*, *Cab* et *EF1- $\alpha$* ) sont visualisés sous U.V. (Gel-Doc EZ, Imager, Biorad, Coutaboeuf, France) et l'intensité des bandes obtenues sur gel est déterminée en utilisant le logiciel d'analyse d'images (Image Lab) couplé au Gel-Doc EZ Imager.

#### II.4.2. Analyse différentielle de l'expression des gènes par RNA-Seq (Article 3)

Cette analyse visant à identifier les gènes racinaires dont l'expression est modulée (induite ou réprimée) par un apport d'une semaine de 1,7 mM de Si, a été réalisée en prestations de services sur la plateforme ISP2 POPS de Saclay (y compris l'analyse statistique inhérente). Le séquençage des ARN est réalisé en utilisant la technologie de séquençage Illumina NexSeq500. Les banques d'ARN-seq sont obtenues *via* le protocole d'ARNm TruSeq Stranded (Illumina®, Californie, U.S.A.) et les échantillons d'ARN sont séquencés en Paired-End avec une taille de 260 pb et une longueur de lecture de 75 bases. L'analyse différentielle (racines traitées au Si *versus* racines non traitées) est réalisée en suivant la méthode décrite par **Rigail et al. (2016)**. Un gène est considéré comme différentiellement exprimé si sa p-value est inférieure à 0,05. Les résultats ont été envoyés sous la forme d'un tableau présentant l'ensemble des gènes différentiellement exprimés (et les p-values) dans les racines traitées (+Si) comparativement à celles non traitées au silicium (-Si).

Les gènes d'intérêt ont été replacés dans les voies métaboliques auxquelles ils sont associés utilisant le logiciel en libre accès MapMan (<https://mapman.gabipd.org/>) après avoir recherché individuellement leur code « gene ontology (GO)» de chaque gène.



### **III. Méthodes d'analyses statistiques**

Les résultats sont exprimés par la moyenne des valeurs obtenues pour l'ensemble des répétitions biologiques ( $n=3$  ou  $n=4$ )  $\pm$  l'erreur standard (SE). La normalité et l'homogénéité des données sont respectivement vérifiées en utilisant le test de Shapiro–Wilk à 95% et le test de Bartlett. Les analyses de variance (ANOVA) sont réalisées en utilisant le test de Tukey's disponible dans la version du logiciel Rx64 3.3.2 permettant de faire des comparaisons multiples des traitements pratiqués. Lorsque seulement 2 traitements sont comparés sur une variable dépendante, un test de Student ( $p<0.05$ ) est pratiqué *via* l'utilisation du logiciel XLState.





# Chapitre III :

## Résultats



# Chapitre III :

## Résultats



## Chapitre III: Résultats

### Chapitre III.1. Silicon promotes growth of *Brassica napus* L. and delays Leaf senescence induced by nitrogen starvation. *Frontiers in Plant Science*, 2018, Doi: 10.3389/fps.2018.00516

**Contexte:** Plusieurs études rapportent un effet bénéfique d'un apport de silicium (Si) chez les plantes, notamment lorsque celles-ci sont soumises à des conditions de stress telles que les carences en nutriments. Le colza est une plante oléagineuse très exigeante en azote, mais présente une faible Efficience d'Usage de l'Azote (EUA) liée à une faible Efficience de Remobilisation de l'Azote (ERA). En effet, durant la sénescence séquentielle, les feuilles chutent avec des teneurs élevées en azote (N) provoquant ainsi une diminution de rendement. Différentes études montrent qu'une augmentation de la durée de vie des feuilles en retardant la sénescence permettrait d'améliorer la remobilisation de l'N des feuilles et pourrait conduire à une augmentation significative du rendement grainier.

**Objectif:** Le but de ces travaux est d'étudier, chez *Brassica napus*, l'effet d'un court apport de Si (7 jours; 1,7 mM) sur la progression de la sénescence foliaire, l'absorption d'N mais également sur la capacité des plantes à reprendre leur croissance après une période de privation en N.

**Démarche expérimentale:** Les plantes de colza sont prétraitées avec du Si (+Si; 1,7 mM) ou non (-Si) pendant 7 jours (D0) avant d'être séparées en quatre lots carencés ou non en N pendant 12 jours (D12): -Si+N; +Si+N, -Si-N; +Si-N. Les plantes carencées en N (+Si-N et -Si-N) sont ensuite réalimentées avec une solution nutritive contenant 1mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  jusqu'à la fin de l'expérimentation (D21). Durant la culture, la cinétique d'expression des gènes *SAG12* et *Cab*, la détermination des teneurs foliaires en  $\text{H}_2\text{O}_2$  et de MDA (marqueurs de stress oxydatif) et en cytokinines a permis de suivre la progression de la sénescence de la feuille mature. En parallèle, les paramètres de croissance et l'expression de gènes codant les transporteurs d'N ont été suivis à des dates clés de la culture.

**Principaux résultats:** Cette étude montre que le colza, en dépit de ses faibles capacités d'accumulation du Si, absorbe cet élément et le stocke majoritairement au niveau racinaire. Un prétraitement au Si permet d'atténuer le stress dû à une carence azotée notamment en réduisant le stress oxydatif au niveau de la feuille mature. Par ailleurs, durant la carence en N, comparativement aux plantes non traitées au Si (-Si-N), un retard de la progression de la sénescence de la feuille mature a été observé chez les plantes +Si-N. Ce retard est associé à un maintien de la teneur en chlorophylles et de l'activité photosynthétique mais également à une teneur en cytokinines plus élevée dans la feuille mature. Lorsque de l'N est à nouveau disponible, il a été montré que, comparativement aux plantes témoins (-Si-N), les plantes prétraitées au Si (+Si-N) présentent une meilleure récupération se traduisant par une augmentation de la teneur en chlorophylles des feuilles matures mais également par une plus forte expression du transporteur racinaire de nitrate (*BnaNRT2.1*).



### III.1. Silicon Promotes Growth of *Brassica napus* L. and Delays Leaf Senescence Induced by Nitrogen Starvation

Cylia Haddad<sup>1,2,3</sup>, Mustapha Arkoun<sup>4</sup>, Franck Jamois<sup>4</sup>, Adrian Schwarzenberg<sup>4</sup>, Jean-Claude Yvin<sup>4</sup>, Philippe Etienne<sup>1,2,3\*\*</sup> and Philippe Laîné<sup>1,2,3\*\*</sup>

<sup>1</sup> Normandie Université, Caen, France,

<sup>2</sup> UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutritions NCS, Université de Caen Normandie, Caen, France,

<sup>3</sup> Institut National de la Recherche Agronomique, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutritions NCS, Caen, France,

<sup>4</sup> Centre Mondial de l'Innovation, Groupe Roullier, Saint-Malo, France

#### Abstract

Silicon (Si) is the second most abundant element in soil and has several beneficial effects, especially in plants subjected to stress conditions. However, the effect of Si in preventing nitrogen (N) starvation in plants is poorly documented. The aim of this work was to study the effect of a short Si supply duration (7 days) on growth, N uptake, photosynthetic activity, and leaf senescence progression in rapeseed subjected (or not) to N starvation. Our results showed that after 1 week of Si supply, Si improves biomass and increases N uptake and root expression of a nitrate transporter gene. After 12 days of N starvation, compared to -Si plants, mature leaf from +Si plants showed a high chlorophyll content, a maintain of net photosynthetic activity, a decrease of oxidative stress markers [hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and malondialdehyde (MDA)] and a significant delay in senescence. When N-deprived plants were resupplied with N, a greening again associated with an increase of photosynthetic activity was observed in mature leaves of plants pretreated with Si. Moreover, during the duration of N resupply, an increase of N uptake and nitrate transporter gene expression were observed in plants pretreated with Si. In conclusion, this study has shown a beneficial role of Si to alleviate damage associated with N starvation and more especially its role in delaying of leaf senescence.

**Keywords:** N privation, N uptake, *SAG12/Cab* indicator, leaf life span, photosynthetic activity

#### III.1.A. Introduction

In the lithosphere, silicon (Si) is the second most abundant element after oxygen both in terms of weight and number of atoms (**Epstein, 1994**). Despite this high abundance in soil, Si is never found in a free form but usually combined with other elements to form oxides compounds or silicates, which are not available for plant nutrition. Thus, only a low proportion





of Si is taken up by roots in the form of uncharged silicic acid  $[\text{Si}(\text{OH})_4]$ , which is present in the soil solution at concentrations ranging from 0.1 to 0.6 mM (**Epstein, 1994**). This Si root uptake involves specific Low Silicon 1 (LSi1) channel identified for the first time in rice by **Ma and Yamaji (2006)**. Si can be then translocated to the shoots thanks to two other Si transporters, i.e., LSi2 [which allows Si efflux outside the Casparian strip in the roots (**Ma et al., 2007**)] and LSi6 expressed only in leaves. Subsequently, Si is polymerized and accumulated in amorphous forms in plant tissues ( $\text{SiO}_2\text{-nH}_2\text{O}$ ) (**Bauer et al., 2011**). Because of the ubiquitous presence of Si in the environment, vascular plants accumulate large ranges of Si, from 0.1 to 15% of dry weight (DW) (**Epstein, 1999**) and agricultural crops are usually classified into three main groups (weak, medium, and strong Si accumulators) according to their Si contents. Thus, dicotyledon species with low Si contents (around 0.1% of DW) are classified as “weak Si accumulators.” Monocotyledon crops are considered either as “intermediate accumulators” if Si content is between 1–3% of DW (as rye, oats, or wheat) or as “strong accumulators” if their Si content reach 15% of DW (as cultivated rice) (**Jones and Handreck, 1967; Epstein, 1999; Broadley et al., 2012**). Although Si is not an essential nutrient for most plants, it is considered to have a beneficial effect on improving resistance against biotic and abiotic stresses and agricultural crop quality and yield (**Epstein, 1994, 1999; Korndorfer and Lepsch, 2001**). For example, in some plants such rice, Arabidopsis and sugarcane, Si confers a protective role and improves pest and pathogen resistance (**Ishiguro, 2001; Meyer and Keeping, 2001; Fauteux et al., 2005**). Some studies have also shown that Si enhances plant tolerance against heavy metals, drought, salinity and nutrient deficiencies (**Epstein, 1999; Chen et al., 2016**). These beneficial effects were usually attributed to the mechanical role of Si (for example by deposition of opal or phytoliths), which acts by reinforcing cell walls and thus increases resistance to many biotic and abiotic stresses (**Fauteux et al., 2005**). Moreover, some authors suggest that the role of Si is more complex and that soluble Si can also act as a signal to modulate metabolic pathways (**Samuels et al., 1991; Fawe et al., 2001; Fauteux et al., 2005**). Indeed, some studies have shown that Si treatment of plants alleviates stress response genes (**Fauteux et al., 2005**) and induces an accumulation of enzymes involved in photosynthesis and detoxification of reactive oxygen species (**Savant et al., 1997; Schmidt et al., 1999**) and also phytohormone synthesis (**Rodrigues et al., 2015; Van Bockhaven et al., 2015**). In cucumber, **Adatia and Besford (1986)** have also observed that Si treatment increases leaf area, leaf erectness chlorophyll and RuBisCo contents. More recently, **Markovich et al.**

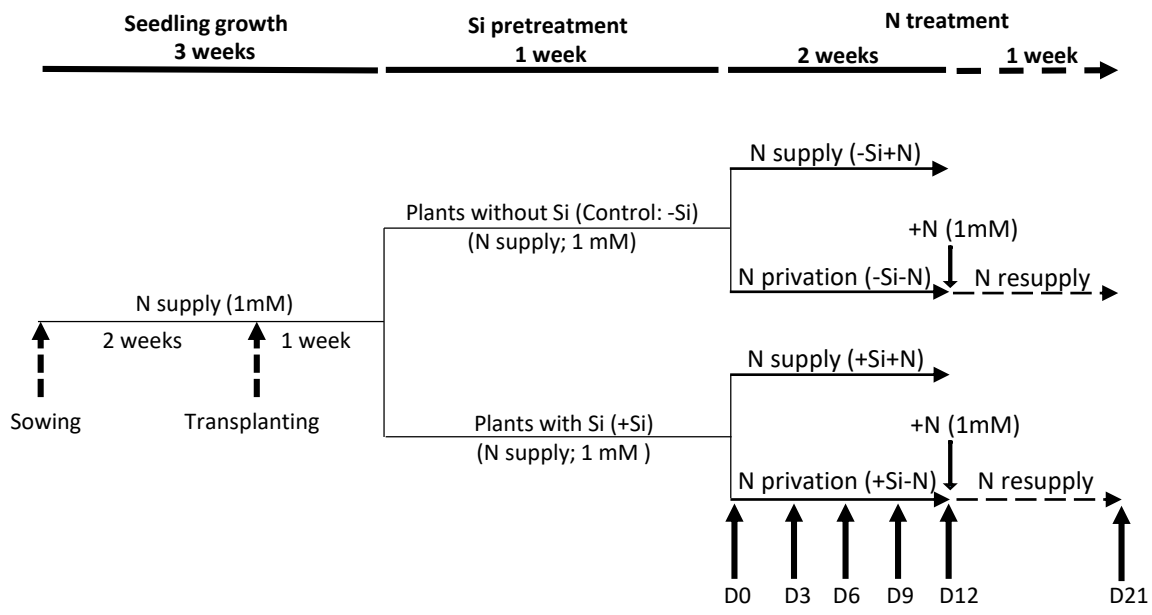


(2017) have shown in detached Arabidopsis leaves overexpressing a rice Si channel (LSi1) that Si treatment promotes a delay of leaf senescence induced by darkness. Taken together, all these studies suggest that Si could increase the leaf life span of plants, particularly when grown under stress conditions. This hypothesis may be of great interest for agricultural crops, such as *Brassica napus* L., characterized by low nitrogen (N) efficiency especially due to its inefficient endogenous leaf N remobilization associated with senescence (Avice and Etienne, 2014). Thus, it has been observed that senescent leaves fall with high N content (2–2.5% of dry weight; Rossato et al., 2001; Malagoli et al., 2005b). As demonstrated by Malagoli et al. (2005a) using a mechanistic model, an extension of the leaf life span could improve N transfer from vegetative to reproductive tissues and consequently allow an increase in yield (around +15%) or N seed content. To our knowledge, apart from works focused on the effect of Si nutrition in alleviating salinity or heavy metal stress (Hashemi et al., 2010; Farshidi et al., 2012; Hasanuzzaman et al., 2017), no studies have explored the effect of Si on growth and leaf senescence in *Brassica napus* grown under N starvation. The aim of this study is to evaluate the effects of a short duration of Si treatment (7 days) on the growth, N uptake and photosynthetic activity of *Brassica napus* L. subjected (or not) to N starvation and then resupply with N. In addition, during this experiment, the Si effect on (i) root and mature leaf cytokinin contents, (ii) oxidative stress markers in mature leaf, and (iii) temporal leaf senescence progression was closely monitored using physiological and molecular senescence indicators.

### III.1.B. Materials and methods

#### a. Plant Growth Conditions and Experimental Design

In a greenhouse, seeds of *Brassica napus* L. var. “Citizen” were germinated on perlite over deionized water for 4 days in the dark. Then seedlings were transferred to natural light conditions and supplied with nutrient solution for 10 days containing:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (1 mM),  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (1 mM),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.4 mM),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.15 mM),  $\text{CaCl}_2$  (3 mM),  $\text{MgSO}_4$  (0.5 mM), EDTA-2NaFe (0.2 mM),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (14  $\mu\text{M}$ ),  $\text{MnSO}_4$  (5  $\mu\text{M}$ ),  $\text{ZnSO}_4$  (3  $\mu\text{M}$ ),  $\text{CuSO}_4$  (0.7  $\mu\text{M}$ ),  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  (0.7  $\mu\text{M}$ ),  $\text{CoCl}_2$  (0.1  $\mu\text{M}$ ), and  $\text{NiCl}_2$  (1  $\mu\text{M}$ ). Just after first leaf emergence (i.e., after 2 weeks), seedlings were transferred for 1 week into a plastic tank (20 L) containing the nutrient solution described above. Natural light was supplied by high pressure sodium lamps (Philips, MASTER



**Figure III.1.1:** Experimental design used to study the effect of silicon pretreatment on growth parameters of *Brassica napus* L. cultivated with or without nitrogen for 12 days and then resupplied with N (from Day 12 to 21). After a period of pretreatment for 1 week with (+Si: 1.7 mM  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) or without silicon (control: -Si), plants were separated into two groups: the first was supplied with 1 mM of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (-Si+N and +Si+N) and the second was N deprived (-Si-N and +Si-N). Day 0 (D0) corresponds to the end of the Si pretreatment and the beginning of the N treatment. After 12 days (D12), N-deprived plants were resupplied with 1 mM of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  until 21 days after the end of the Si pretreatment (D21). Plants were harvested after 0, 3, 6, 9, 12, and 21 days for N-deprived plants (dashed arrows).

GreenPower T400W) with a PAR (Photosynthetically Active Radiations) of  $450 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  at canopy height. At the emergence of the fourth leaf, silicon (Si) pretreatment was applied for 1 week (**Figure III.1.1**). For this, plants were separated into two groups: the first (+Si) was supplied with the nutrient solution described above with the addition of 1.7mM silicon (Si as sodium metasilicate:  $\text{Na}_2\text{SiO}_3\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) and the second (-Si; Control) with the nutrient solution plus NaCl (3.4 mM) to compensate the sodium supplied by sodium metasilicate in the +Si treatment. Nutrient solutions were aerated and renewed every 3 days and their pH was adjusted daily to 5.6 with HCl (or NaOH). After the Si pretreatment period (Day 0), plants were again divided into two groups: one half of each of the +Si and -Si plants was supplied with 1mM of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (-Si+N and +Si+N) and the other halves were N deprived (-Si-N and +Si-N). All plants were grown in these N conditions for 12 days (D12). Then, N-deprived plants (-Si-N or +Si-N) were resupplied with 1 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  for 9 days (D21) to study the effect of Si pretreatment on their capacity to take up newly supplied N (**Figure III.1.1**). Throughout the experiment, plants were grown with a thermoperiod of 20/17 C day/night and a photoperiod of 16 h. Plants were harvested at 0, 3, 6, 9, and 12 days and at 21 days for N-deprived plants, which were resupplied with N (**Figure III.1.1**). At each harvest, shoots and roots were separated, and then from shoot, mature leaf corresponding to leaf with maximal area and biomass was separated (**Supplementary Figure III.1.S1**). Different tissues were frozen in liquid N and stored at -80 C for further analysis. An aliquot of each tissue was dried in an oven (60°C) for DW determination.

#### **b. Chlorophyll Contents and Net Photosynthetic Activity of the Mature Leaf**

According to **Ruiz-Espinoza et al. (2010)**, a SPAD-502 chlorophyll meter (Soil Plant Analysis Development; Minolta, model SPAD-502) was used as a relevant non-destructive method to estimate leaf chlorophyll content. The measurements of SPAD values were performed every day in mature leaves selected at the beginning of N starvation (D0). After 2 hours of illumination, net photosynthetic activity was monitored on the same leaf using a LI-6400 (LI-COR, Lincoln, NE, United States) at  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  photosynthetic photon flux (PPF) provided by a LED light.



### c. Total Nitrogen and Silicon Analysis

An aliquot of dry plant tissue was crushed to powder and placed in a capsule for isotopic analysis to analyze between 60 and 80  $\mu\text{g}$  N. The total N was determined with a continuous flow isotope mass spectrometer (Isoprime, GV Instruments, Manchester, United Kingdom) linked to a C/N/S analyser (EA3000, EuroVector, Milan, Italy).

Silicon contents in plants tissues were determined at day 0 using a colorimetric method previously described by **Dai et al. (2005)**. Briefly, 100 mg of dried and crushed plants tissues were added to 3 ml of NaOH (50%) and autoclaved at 121°C for 20 min. After adjustment of the volume to 10 ml with ddH<sub>2</sub>O, 160  $\mu\text{l}$  of sample solution were transferred into a 2 ml tube containing 1.2 ml of acetic acid (20%). Then 400  $\mu\text{l}$  of ammonium molybdate solution (43.7 mM, pH 7) were added and mixed thoroughly. After 5 min, 200  $\mu\text{l}$  of tartaric acid (20%) and 40  $\mu\text{l}$  of reducing solution were added (made by mixing solution A: 2 g of Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> and 0.4 g of 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid in 25 mL of dH<sub>2</sub>O and solution B: 25 g of NaHSO<sub>3</sub> in 200 ml of ddH<sub>2</sub>O and adjusted to 250 ml with ddH<sub>2</sub>O). After 30 min, the absorbance was measured at a wavelength of 650 nm and the silicon content was determined by referring to a standard curve prepared from a silicon solution standard at 1000 SiO<sub>2</sub> mg.L<sup>-1</sup>. All reagents were stored in plastic bottles.

### d. RNA Extraction, Reverse Transcription, Q-PCR and Semi Quantitative PCR Analysis

Total RNAs were extracted from 200 mg of mature leaves or roots. Samples were ground to a powder with a pestle in a mortar containing liquid nitrogen. The resulting powder was mixed with 750  $\mu\text{l}$  extraction buffer (0.1 M TRIS, 0.1 M LiCl, 1 mM EDTA and SDS10% (W/V), and pH8) and 750  $\mu\text{l}$  of hot phenol (80°C, pH4), and the mixture was vortexed for 40 s. After the addition of chloroform/isoamyl alcohol (24:1), the homogenate was centrifuged at 15000 g (5 min at 4°C). The supernatant was transferred into 750  $\mu\text{l}$  of LiCl solution (4 M) and incubated overnight at 4°C. After centrifugation (15000 g for 30 min at 4°C), the pellet was suspended in 100  $\mu\text{l}$  of sterile water. Purification of RNAs including a step of DNA digestion by DNase treatment was performed using RNeasy mini kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen, Courtaboeuf, France). Quantification of total RNAs was performed by spectrophotometry at 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq, France) before Reverse Transcription (RT) analysis and the quality of RNAs (**Supplementary Figure III.1.S3**) is





monitored by separation of 1 µg of total RNAs on agarose gel (1% w/v) containing ethidium bromide (0.5 µg/ml). For reverse transcription, 1 µg of total RNAs was converted to cDNA with an iScript cDNA synthesis kit using the manufacturer's protocol (Bio-Rad) before quantitative (Q-PCR) or semi quantitative PCR analysis.

For Q-PCR amplification the following primers were selected: *EF1* (Forward: 5'-TTTCGAGGGTGACAACATGA-3'; Reverse: 5'-CCGTTCCAATACCACCAATC-3') and *18S* (Forward: 5'-CGGATAACCGTAGTAATTCTAG-3'; Reverse: 5'-GTACTCATTCCAATTACCAGAC-3') as housekeeping genes. *BnaNRT1.1* (Forward : 5'-ATGGTAACCGAAGTGCCTTG-3'; Reverse : 3'-TGATTCCAGCTGTTGAAGC-5'), *BnaNRT2.1* (Forward: 5'-TGGTGAATAGGCGGCTCGAGTTG-3'; Reverse: 5'-GTATACGTTTTGGGTCATTGCCAT-3'), and *BnaAMT1.1* (Forward: 5'-GTCCTTGACGCTGCAGCCGGTG-3'; Reverse: 5'-CGGGCTGGCCCATCCATCAAC-3') as target genes. The Q-PCR reactions were performed with 4 µL of 200X diluted cDNA, 500 nM of the primers and 1X SYBER Green PCR Master Mix (Bio-Rad) in a total volume of 15 µL in a ChromoFour System (Bio-Rad). For each pair of primers, a threshold value and PCR efficiency were determined using a cDNA preparation diluted >10-fold. For both pairs of primers, PCR efficiency was ≈100%. The specificity of PCR amplification was examined by monitoring the presence of the single peak in the melting curves after Q-PCRs and by sequencing the Q-PCR product to confirm that the correct amplicons were produced from each pair of primers. The relative expression of the target gene in each sample was compared to the control sample and was determined with the delta-delta Ct method using the following equation:

$$\text{Relative expression} = 2^{-[\Delta\text{Ct sample} - \Delta\text{Ct control}]}$$

With  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{target gene}} - \text{Ct}_{\text{housekeeping genes}}$

Where the Ct of housekeeping genes is the geometric mean between the Ct of two housekeeping genes.

Relative expression of the different nitrogen transporter genes in the control sample was made equal to one and the relative expression of the other treatments was then compared with the control (**Livak and Schmittgen, 2001**).

According to **Gombert et al. (2006)**, analysis of *BnaSAG12* and *Cab* gene expression was performed using semi quantitative PCR. Reactions were performed using specific primers for the *Brassica napus Cab* gene *LHCII type I* (Forward: 5'-GGCAGCCCATGGTACGGATC-3'; reverse:



5'-CCTCCTTCGCTGAAGATCTGT-3'), *BnaSAG12* (Forward: 5'-GGCAGTGGCACACCAMCCGGTTAG-3'; reverse: 5'-AGAAGCMTTCATGGCAAGACCAC-3') as target genes and *EF1- $\alpha$*  (Forward: 5'-TTTCGAGGGTGACAACATGA-3'; reverse: 5'-CCGTTCCAATACCACCAATC-3') as an internal control gene (Nicot et al., 2005).

PCRs were performed with Qbiogene Taq polymerase (MP Biomedicals, Illkirch, France) on a thermocycler (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol. The amplification program was as follows: 1 cycle at 95°C for 5 min, 20 for *Cab* and *BnaSAG12* and 26 for *EF1- $\alpha$*  cycles including a denaturing step at 95°C for 30 s, a primer's hybridization step at 58°C for 45 s and an amplification step at 72°C for 1 min. Each PCR reaction was finished with one cycle at 72°C for 10 min. Four single 267, 220, 161, and 164 bp cDNAs were amplified for the *BnaSAG12*, *Cab*, and *EF1- $\alpha$*  genes, respectively, and the identity of each fragment was checked by sequencing (Biofidal, Vaulx-en-Velin, France). RT-PCR products were separated by electrophoresis via agarose gels (1%) containing ethidium bromide (0.5  $\mu$ g/ml).

These agarose gels were scanned under UV light with a Gel Doc™ EZ scanner (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and the transcript levels were quantified with ImageLab™ software (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) after normalization with the *EF1- $\alpha$*  gene. The data related to the *BnaSAG12* and *Cab* transcript levels were expressed as a percentage of the maximum of both transcripts observed in mature leaves (the maximum level of transcripts was observed at day 21 for *BnaSAG12* and day 0 for *Cab*). The date of entry into senescence of mature leaves was determined according to the method of Gombert et al. (2006); the theoretical time (Th.T.) of senescence for a given leaf rank is determined using the time course of expression of *BnaSAG12* (up-regulated during senescence) and *Cab* (down-regulated during senescence). The intersection point corresponding to the concomitant up-regulation of *BnaSAG12* and down regulation *Cab* genes was considered as the time of onset of foliar senescence.

#### e. Cytokinin Analysis by UHPLC-MS/MS

To 10 mg of frozen grounded leaves and roots, 1 mL of a solution at -20 C of 70% MeOH/29% H<sub>2</sub>O/ 1.0% formic acid containing isotopically labeled internal standards at 0.2 ng/mL ([<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Dihydrozeatin, [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Dihydrozeatin riboside, [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]<sup>N</sup><sup>6</sup>-Isopentenyladenine,



[<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]N<sup>6</sup>-Isopentenyladenosine, [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-trans-zeatin) was added. The mix was stirred at room temperature for 30 min then centrifuged (16000 rpm; 4°C).

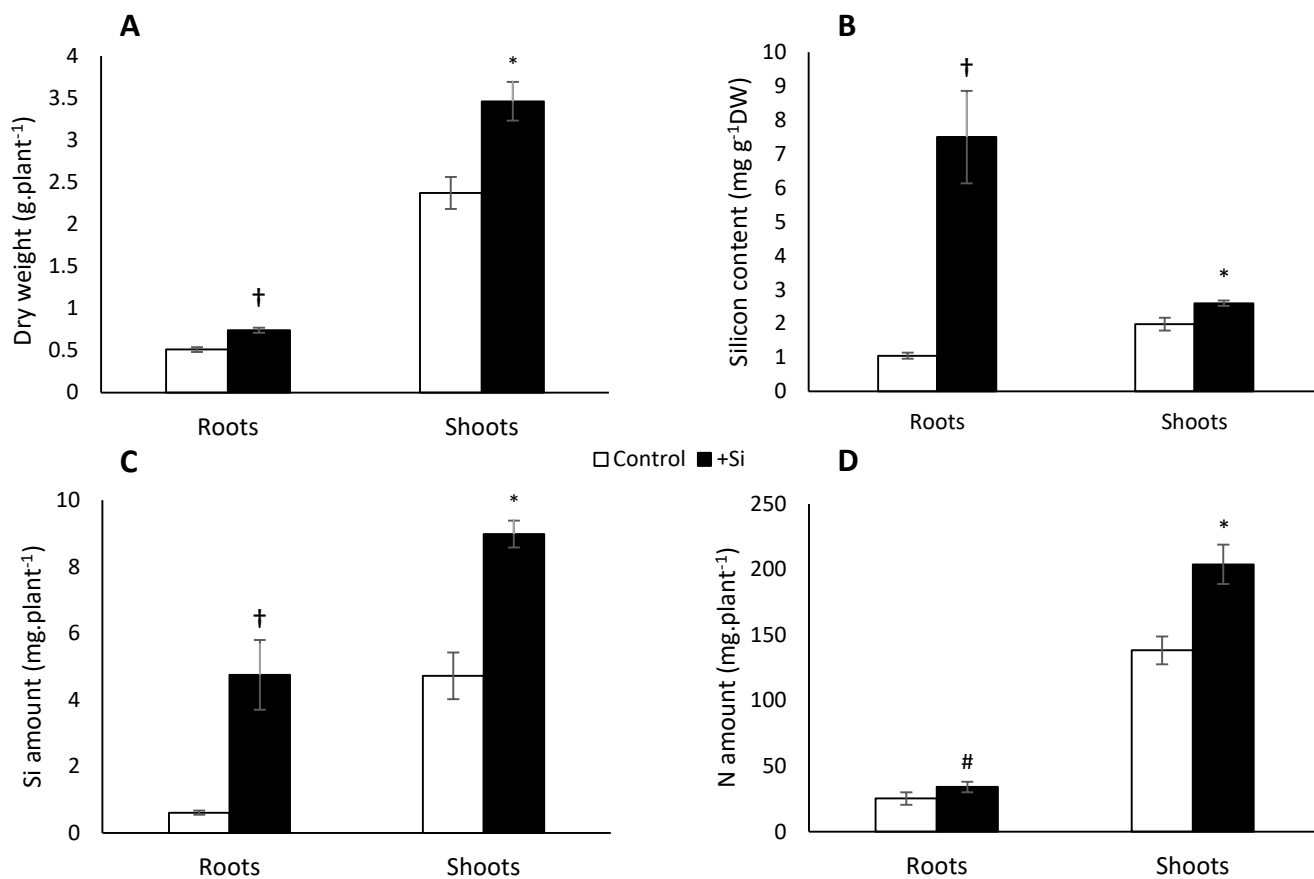
The supernatant was evaporated to dryness under nitrogen using a Turbovap LV system (Biotage, Sweden). Dry extracts were dissolved with 2 mL of a 2% formic acid solution. The extracts were purified using a solid phase extraction (SPE) Evolute express CX 3 mL-60 mg (Biotage, United Kingdom).

The extracts were added in two steps to improve cytokinins retention, then the samples were washed with 1 mL of 2% formic acid / 98% H<sub>2</sub>O solution. A second wash was performed with 1 mL of MeOH. The elution of the cytokinins was done with 2 mL of a 95% MeOH/5% NH<sub>4</sub>OH solution in two steps. The eluates were evaporated to dryness and dissolved in 100 mL of H<sub>2</sub>O containing 0.1% of formic acid before analysis by using UHPLC-MS/MS system.

The separation and detection were achieved using a Nexera X2 UHPLC system (Shimadzu, Japan) coupled to a QTrap 6500+ mass spectrometer (Sciex, Canada) equipped with an IonDrive™ turbo V electrospray (ESI) source. 2 µl of cytokinins extract was separated into a Kinetex Evo C18 coreshell column (100 mm X 2.1 mm, 2.6 µm, Phenomenex, United States) at a flow rate of 0.7 mL/min, and the column oven maintained at 40°C. The mobile phases were composed of solvent A Milli-Q water (18 MΩ, Millipore, United States) containing 0.1% formic acid (LCMS grade, Fluka analytics, Germany), and solvent B acetonitrile LCMS grade (Fisher Optima, United Kingdom) containing 0.1% formic acid. The gradient elution started with 2% B, 0.0–3.0 min 20% B, 3.0–4.0 min 25% B, 4.0–4.5 min 100% B, 4.5–6.0 min 100% B, 6.0–6.5 min 2%, and 6.5–8.5 min 2% B. The capillary voltage was set to 5kV producing mainly [MCH]<sup>+</sup> ions. All quantitative data was processed using MultiQuant software V 3.0.2 (Sciex, Canada).

#### **f. Determination of Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and Malondialdehyde (MDA) Contents**

Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) was determined according to the method previously described by **Yu et al. (2003)**. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was extracted from 200 mg of fresh mature leaf homogenized with 3 ml of 50 mM potassium-phosphate buffer (pH 6.5) at 4°C. After centrifugation, (11500 X g; 15 min), the supernatant (3 ml) was mixed with 1 ml of 0.1% TiCl<sub>4</sub> in 20% sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; v/v).



**Figure III.1.2:** Dry weight (A), total silicon content (B), silicon amount (C) and total nitrogen amounts (D) in shoots and roots of *Brassica napus* L. at the end of the Si pretreatment (Day 0). This harvest time (Day 0) corresponds to the end of the pretreatment period of plants with (+Si) or without Si (-Si; Control). Data are means  $\pm$  SE (for n = 4). \* and † indicate significant differences between -Si (control) and +Si plants with p < 0.05 and p < 0.001, respectively.

The mixture was then centrifuged (11500 X g; for 15 min) and the supernatant was used for measurement of absorbance at 410 nm. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content was calculated using  $\epsilon = 0.28 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  as the molar extinction coefficient and expressed as  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$ .

Lipid peroxidation was estimated from malondialdehyde (MDA), a decomposition product of the peroxidized polyunsaturated fatty acid component of the membrane lipid. The MDA content in mature leaf at Day 12 (-Si-N and +Si-N) was determined based on thiobarbituric acid-reacting substances (TBARS) as previously described in **Hasanuzzaman et al. (2011)**. Briefly, fresh leaf tissue (0.2 g) were homogenized with 4 ml of 5% trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged at 5000 X g during 30 min. A total of 1 mL of the supernatant was mixed with 4 mL of 0.5% TBA made in 20% TCA, incubated at 95°C for 30 min, then quickly cooled on ice, before measurement of absorbance at 532 and 600 nm. Then, the MDA content was calculated based on the difference in absorbance ( $A_{532} - A_{600}$ ) and is expressed as  $\text{nmol g}^{-1} \text{FW}$ . For this,  $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  was used as the molar extinction coefficient.

#### **g. Statistical Analysis**

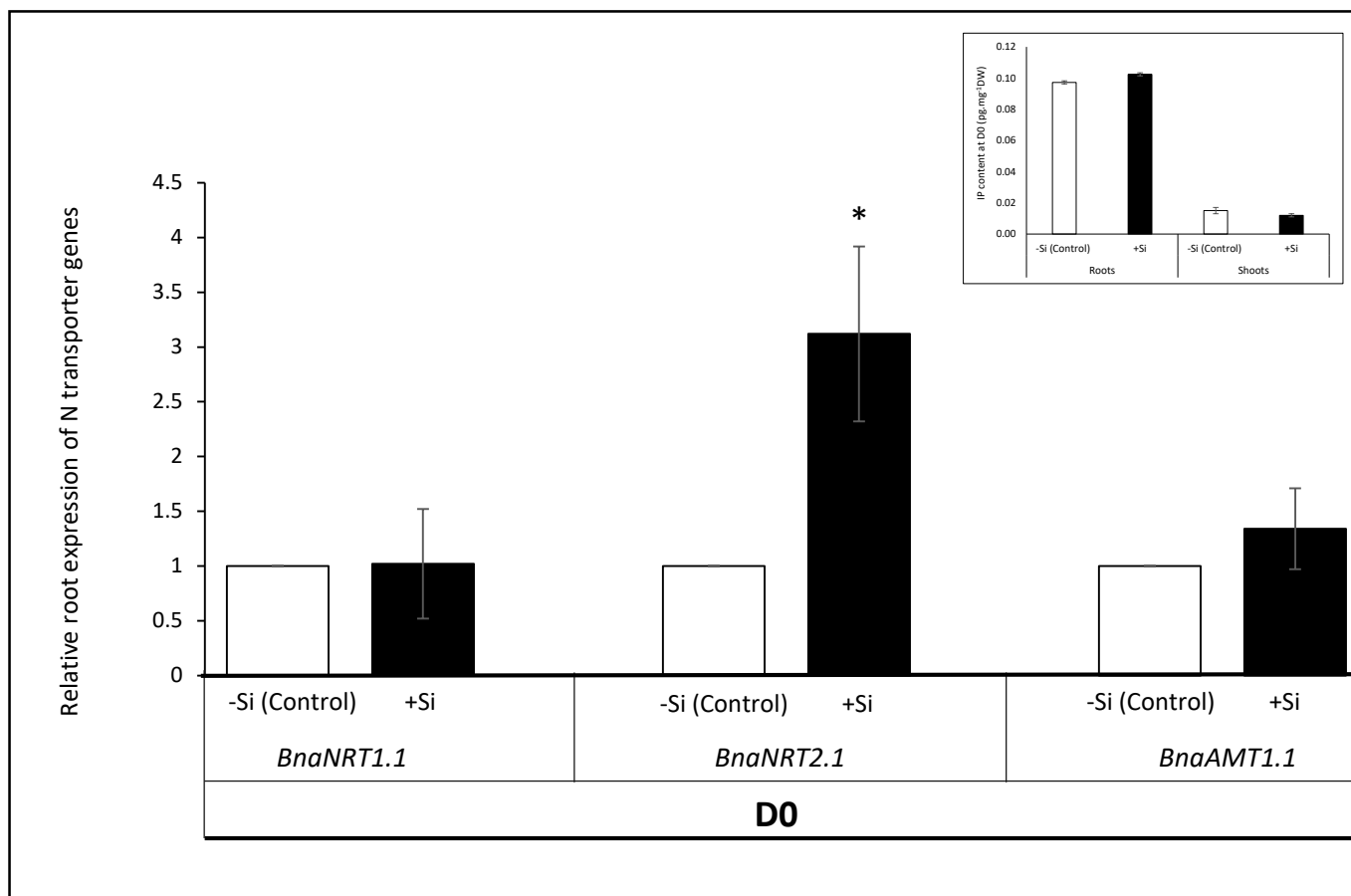
The experiment was performed with three replicates except for measurements at day 0, which were performed with four replicates due to the weak biomass of the plants. The resulting variations in data are expressed as the mean  $\pm$  standard error (SE) for  $n = 3$  (or  $n = 4$  at D0). The results were subjected to statistical analysis in R software. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) after verifying compliance of normality of the data and homogeneity of variance using the Shapiro–Wilk and Bartlett tests, respectively. Mean values were compared using Tukey’s test.

### **III.1.C. Results**

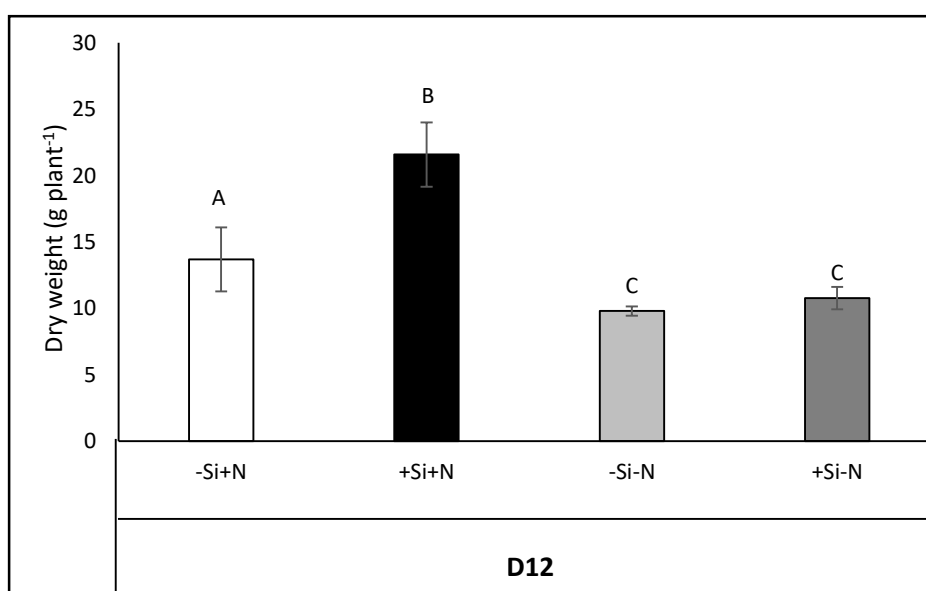
#### **a. Plant Growth, Si and N Uptakes and Root Cytokinin Content in *Brassica napus* Treated With Silicon (Day 0)**

The biomass of whole plants treated with silicon (+Si) was significantly higher than control plants (-Si) and rose  $4.2 \text{ mg plant}^{-1}$  versus  $2.9 \text{ mg plant}^{-1}$ , respectively. Both root and shoot biomasses were significantly higher in +Si plants and were about 0.8 and 3.5 mg, and 0.5 and  $2.4 \text{ mg plant}^{-1}$  for +Si and -Si plants, respectively (**Figure III.1.2A**). The Si content in +Si whole plants was also significantly higher than in -Si whole plants. Consequently, the total amount of Si was 2.6-fold higher in +Si plants than control ( $13.73$  versus  $5.33 \text{ mg plant}^{-1}$ )





**Figure III.1.3:** Relative root expression of the *BnaNRT1.1*, *BnaNRT2.1*, and *BnaAMT1.1* genes in *Brassica napus* L. at the end of the Si pretreatment period (D0). This harvest time (Day 0) corresponds to the end of the pretreatment period of plants with (+Si) or without Si (-Si; Control). Insert represents active cytokinin (Isopentenyladenine: IP) contents in roots. Detail of cytokinin contents are available in **Supplementary Table S1**. Data are means SE (for n = 4). Indicates significant differences between -Si (control) and +Si plants with  $p < 0.05$ .



**Figure III.1.4:** Effect of Si pretreatment on total dry weights of *Brassica napus* L. supplied or not supplied with N. During the 12 days after the Si pretreatment, control (-Si) and Si pretreated (+Si) plants were grown with (-Si+N, +Si+N) or without N (-Si-N, +Si-N). Data are means SE (for n = 3). Different capitals indicate that the means of total plant dry weights are significantly different at  $p < 0.05$ .

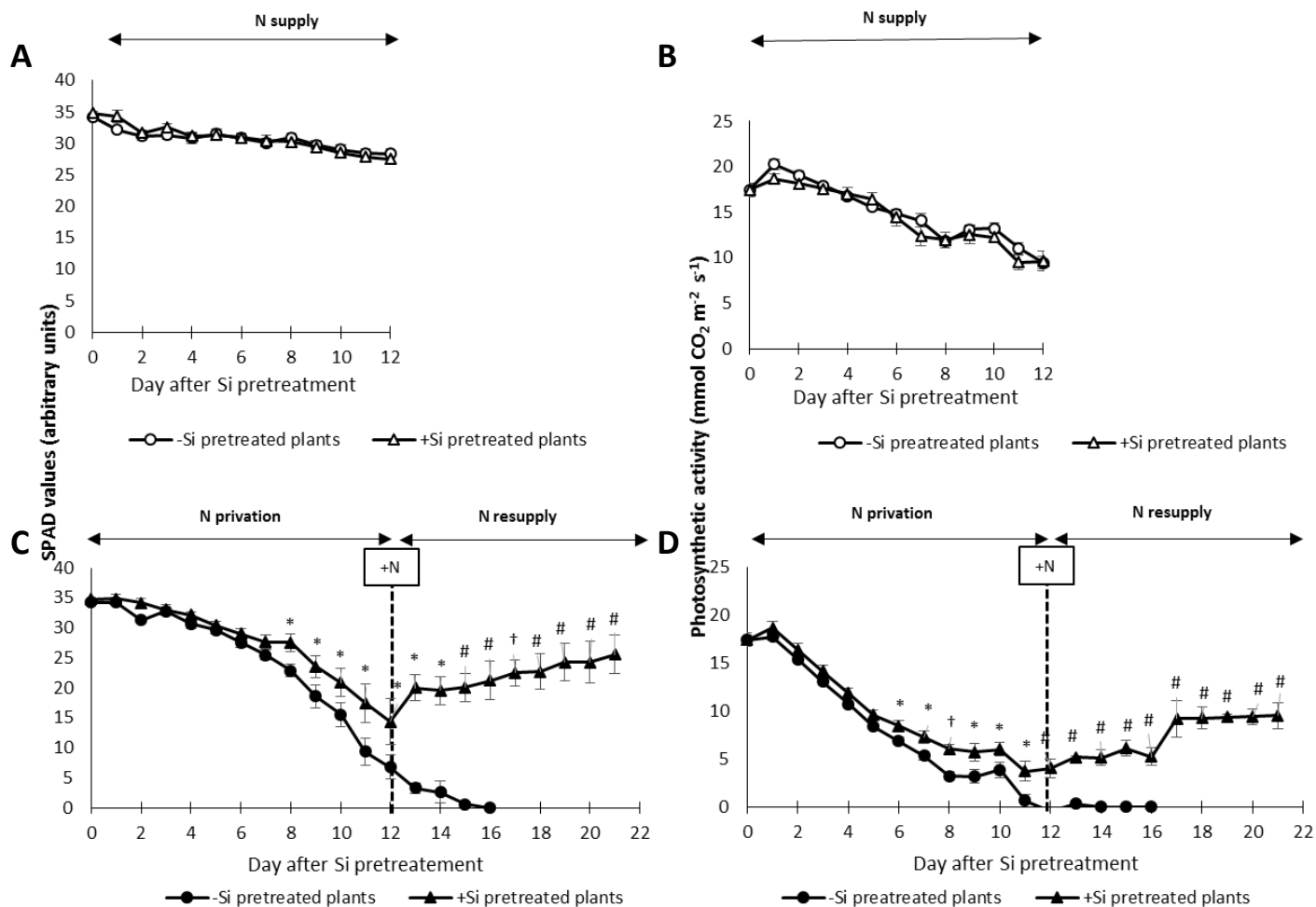
(**Figure III.1.2B**). Moreover, in +Si plants, Si content was significantly higher in root than in shoot content (0.75% versus 0.26%) (**Figure III.1.2C**).

In +Si plants, the total N amount was significantly increased in shoot (1.50-fold) and roots (1.35-fold) compared to -Si plants (**Figure III.1.2D**). At the same time, in +Si plants the relative expression level of *BnaNRT2.1* (encoding high affinity nitrate transporter) in the roots increased significantly (3-fold) compared to -Si plants, while the expression level of the *BnaNRT1.1* and *BnaAMT1.1* genes (encoding low affinity nitrate and ammonium transporters, respectively) remained the same (**Figure III.1.3**). Moreover, except a decrease of root trans-zeatin (t-Z) content observed in plant treated with Si, all other cytokinin contents at D0 (and especially N<sub>6</sub>- Isopentenyladenine (IP) considered as one of the main active forms) studied in roots and shoots remained the same level in -Si and +Si plants (**Figure III.1.3 and Supplementary Table III.1.S1**).

After this period of Si pretreatment, -Si and +Si plants were transferred for 12 days onto a solution deprived of Si and containing (+N) or lacking (-N) N (**Figure III.1.4**). In +N conditions, the total biomass of plants previously treated with Si (+Si+N) was significantly higher than in plants not supplied with Si pretreatment (-Si+N). Indeed, the biomass of +Si+N plants reached 21.59 g plant<sup>-1</sup> versus only 13.69 g plant<sup>-1</sup> for -Si+N plants. Under -N conditions, the total biomasses of +Si and -Si plants were significantly lower than the total biomasses of plants grown under +N conditions. Moreover, whatever the Si pretreatment (+Si or -Si), the total plant biomasses (about 10 g.plant<sup>-1</sup>) were not significantly different (**Figure III.1.4**).

#### **b. Effect of Si Pretreatment on the Evolution of Physiological Indicators of Leaf Senescence**

To follow the impact of Si pretreatment on leaf senescence progression, non-destructive physiological senescence indicators (net photosynthetic activity and SPAD values) were monitored in mature leaves from plants grown with or without N for 12 days. Under +N conditions, a Si pretreatment had no effect on SPAD values or the photosynthetic activity of mature leaves compared to control (-Si) (**Figures III.1.5A,B**). From day 0 to day 12 the SPAD values and net photosynthetic activity of mature leaves of -Si plants under N deficiency (-N) decreased from 35 to 5 SPAD units and from 18 to 0 mmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, respectively.



**Figure III.1.5:** Change in SPAD values and net photosynthetic activity of mature leaf from *Brassica napus* L. Plants were pretreated with (+Si) or without (–Si) and supplied with (N supply; A,B) or without nitrogen (N starvation; C,D) for 12 days. After this time, N-deprived plants were resupplied with N (N resupply; C,D) for 9 days (D21). Data are means  $\pm$ SE (for n = 3). \*, #, and † indicate significant differences between –Si (control) and +Si plants with  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , and  $p < 0.001$ , respectively.

Compared to -Si plants, no difference in the SPAD value and net photosynthetic activity in +Si plants was observed until days 7 and 5, respectively. After these times, the values of both of these physiological parameters remained significantly higher in +Si plants than in -Si mature leaves. Thus, after 12 days of N starvation, SPAD values and net photosynthetic activity were 14.35 SPAD units (versus 6.8 in -Si plants) and  $4.0 \text{ mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (versus 0 in -Si plants), respectively (**Figures III.1.5C,D**).

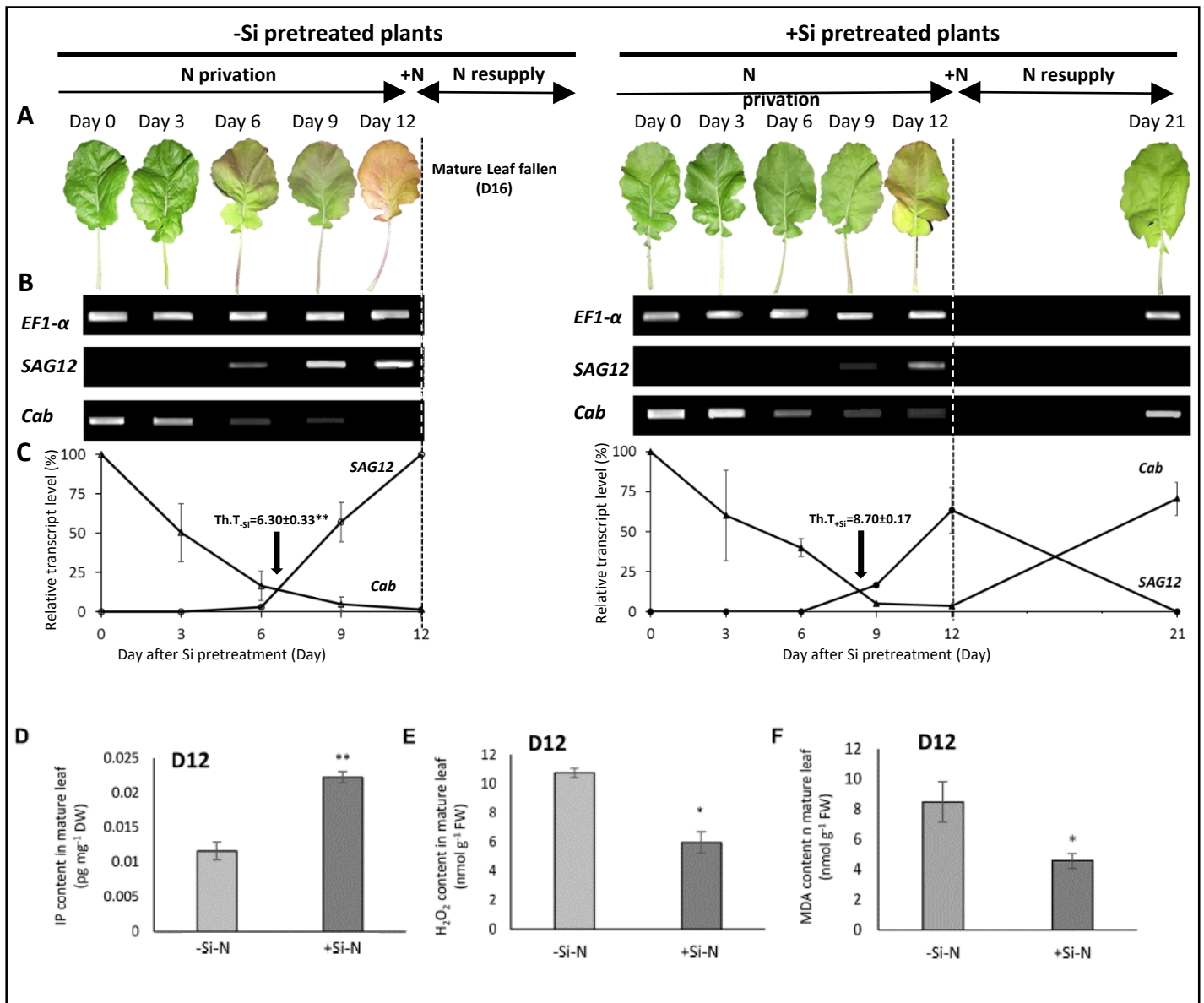
After this period of N starvation, -Si and +Si plants were resupplied with nitrogen from day 12 to day 21 and both physiological parameters were measured (**Figures III.1.5C,D**). In -Si plants, net photosynthetic activity remained zero and SPAD values decreased continuously to reach 0 SPAD units at 16 days, corresponding to the time when mature leaf fall was observed. In contrast, when +Si plants were resupplied with N, increases in both physiological parameters were observed in mature leaves and reached 25.5 SPAD units and  $9.5 \text{ mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  at day 21, respectively (**Figures III.1.5C,D**).

### c. Effect of Si Pretreatment on the Evolution of Molecular Indicators Senescence and Cytokinin, Malondiadehyde and Hydrogen Peroxide Contents in Mature Leaf

Considering the evolution of physiological indicators of senescence previously studied (**Figure III.1.5**), a relevant molecular indicator of *Brassica napus* leaf senescence (*BnaSAG12/Cab*) was used to characterize the senescence progression in -Si and +Si mature leaves from plants cultivated under N starvation (from D0 to D12) and after N resupply (from D12; **Figure III.1.6**).

The phenotypic evolution of mature leaves from -Si-N plants (**Figure III.1.6A**) began with yellowing from day 6, and increased daily until day 9 when the leaf was fully yellow. In +Si-N plants, mature leaf yellowing only started between 9 and 12 days of N starvation.

In *Brassica napus*, previous studies have demonstrated that the onset of leaf senescence is characterized by a concomitant down and up-regulation of *Cab* and *BnaSAG12* gene expression, respectively (**Gombert et al., 2006**). Considering this, time course of *Cab* and *BnaSAG12* genes expression was estimated in mature leaves from N-deprived plants. The results indicated a concomitant down- and up-regulation of *Cab* and *BnaSAG12* from 6 days



**Figure III.1.6:** Images, changes in *SAG12/Cab* molecular senescence indicators and active cytokinin, hydrogen peroxide, and malondialdehyde contents in mature leaf from N-deprived *Brassica napus* pretreated or not with Si. **(A)** Images of mature leaf from plants pretreated without (–Si) or with Si (+Si) cultivated during 12 days without N (–N; from D0 to Day 12) and resupply with N (+N; from Day 12). **(B)** *BnaSAG12* and *Cab* gene expressions monitored by RT-PCR in mature leaves harvested after 0, 3, 6, 9, and 12 days of N starvation and 9 days after N resupply (day 21). *EF1-α* was used as a cDNA synthesis and amplification control. **(C)** Quantification of *BnaSAG12* and *Cab* transcripts using ImageLab™ software after normalization with the *EF1-α* gene. Arrows indicate the theoretical time (Th.T.) of the onset of senescence of mature leaf determined as previously described by **Gombert et al. (2006)**. **(D)** Active cytokinin (N6-Isopentenyladenine: IP) content in mature leaf at 12 from plants pretreated without (–Si) or with (–Si) Si and cultivated without N (–N) during 12 days (From D0 to D12). **(E)** Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) content in mature leaf at 12 from plants pretreated without (–Si) or with (–Si) Si and cultivated without N (–N) during 12 days (From D0 to D12). **(F)** Malondialdehyde (MDA) content in mature leaf at 12 from plants pretreated without (–Si) or with (–Si) Si and cultivated without N (–N) during 12 days (From D0 to D12). Data are means SE (for n = 3). \* and \*\* indicate significant differences between –Si and +Si plants with p < 0.01 and p < 0.05, respectively.

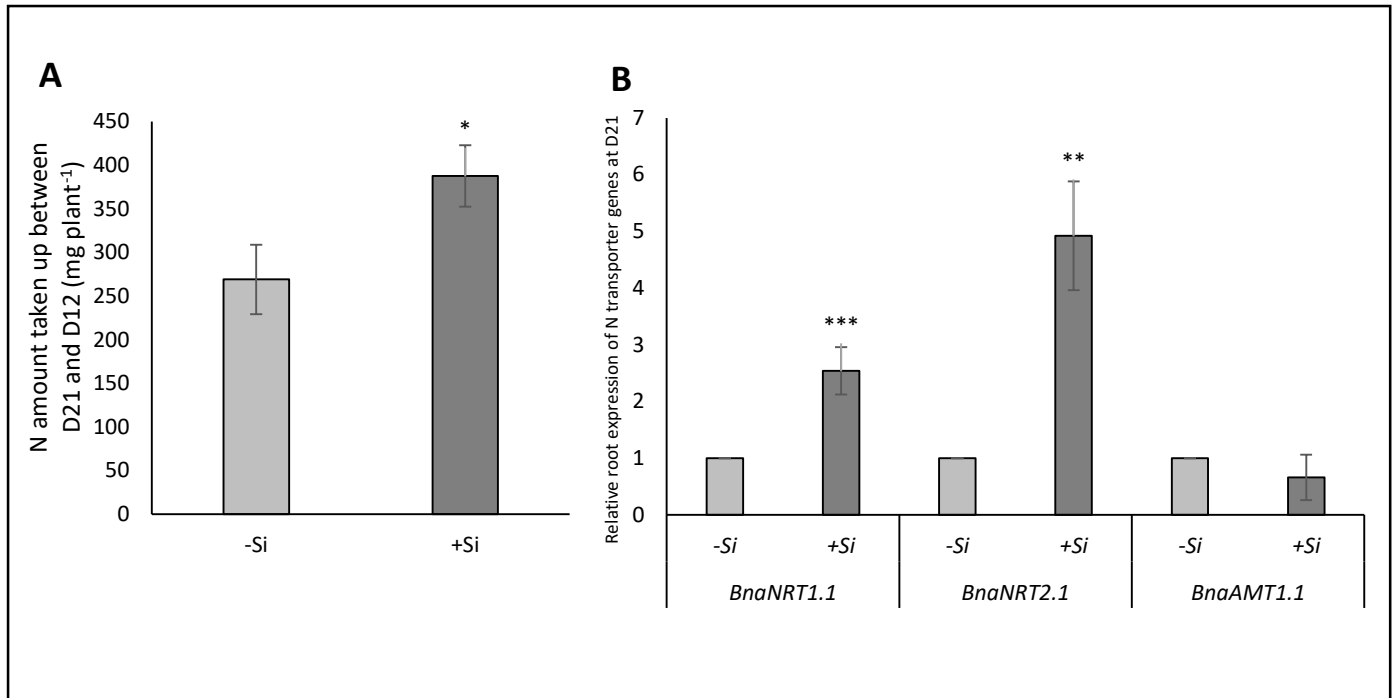
in –Si-N plants, respectively. In +Si-N plants the same expression pattern of *Cab* and *BnaSAG12* was observed only after 9 days of N starvation (**Figure III.1.6C**).

The kinetic quantification of *BnaSAG12* and *Cab* expression allowed determination of the Th.T. of the onset of mature leaf senescence, and was characterized by the intersection point between curves of the *Cab* and *BnaSAG12* transcript levels. Under -N conditions, Th.T was 6.3 versus 8.7 days in mature leaves of -Si and +Si plants, respectively (**Figure III.1.6C**). All these results indicated that Si pretreatment is associated with a delay in leaf senescence (+2.4 days) in plants grown under N starvation. Surprisingly, when N deprived plants were resupplied with N (from D12), a down regulation of *BnaSAG12* and an up-regulation *Cab* gene expression were observed at D21 in mature leaf from +Si plants while the same leaf was fallen at D16 in -Si plants (**Figures III.1.6B,C**). This data indicating a reversion of senescence process only in mature leaf of +Si plants is in agreement with the greening again but also with the photosynthetic activity recovery and the increase of SPAD of this leaf previously observed (**Figure III.1.5**).

At the end of the N starvation period cytokinin contents (and especially IP content) were determined in +Si and -Si mature leaf from N-deprived plants, (**Figure III.1.6D** and **Supplementary Table III.1.S1**). At D12 (corresponding to the end of N starvation), IP contents is significantly higher in mature leaf of +Si-N plants (1.9-fold; **Figure III.1.6D**) than in mature leaf of –Si-N while other cytokinin contents [i.e., trans-zeatin and N6- Isopentenyladenosine (IPAdo)] remain at the level whatever Si treatment (**Supplementary Table III.1.S1**). Moreover, at Day 12, the oxidative stress markers, i.e., H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA were significantly lower in +Si-N than in –Si-N mature leaf. Thus, in mature leaf of +Si-N plants, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA contents were 5.9 μmol g<sup>-1</sup> FW (versus 10.7 in –Si-N) and 4.6 nmol g<sup>-1</sup> FW (versus 8.5 in –Si-N), respectively.

#### **d. N Uptake and N Transporter Gene Expression After the N Resupply Period in N-Deprived Plants Previously Pretreated or Not Treated With Si**

During the 9 days of N resupply, +Si-N plants took up more N than –Si-N plants (268 versus 388 mg plant<sup>-1</sup>) (**Figure III.1.7A**). This 1.5-fold increase in N uptake by +Si-N plants was associated with root up-regulation of the nitrate transporter genes, *BnaNRT1.1* and *BnaNRT2.1*. Indeed, compared to -Si-N, the relative expression levels of *BnaNRT1.1* and *BnaNRT2.1* in +Si-N plant roots were increased by 2.5 and 4.9-fold, respectively. At the same



**Figure III.1.7:** Amount of nitrogen taken up by plants between 12 (D12) and 21 days (D21; **A**), and the relative root expression of the *BnaNRT1.1*, *BnaNRT2.1*, and *BnaAMT1.1* genes in *Brassica napus* (**B**). Plants were pretreated with (+Si) or without (Control: -Si) silicon after N starvation for 12 days (D12) and 9 days after N resupply (D21). Data are means SE (n = 3). \*, \*\* and \*\*\* indicate significant differences between -Si (Control) and +Si plants with  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively.

time, no effect of Si pretreatment was observed on root expression of the ammonium transporter, *BnaAMT1.1* (**Figure III.1.7B**).

#### III.1.D. Discussion

The aim of this study was to evaluate the effect of a short pretreatment with silicon (1 week) on growth, N uptake, chlorophyll content, net photosynthetic activity and temporal leaf senescence progression induced by N starvation in *Brassica napus* L.

Our study showed that *Brassica napus*, which is considered non-Si accumulator species (<10 mg g<sup>-1</sup> DW; **Guntzer et al., 2012b**), is able to take up and store Si in roots in particular (**Figures III.1.2B,C**). This result is in agreement with previous work that has shown Si root storage in *Brassica napus* grown in hydroponic conditions with Si (**Farshidi et al., 2012**).

After a short period of Si treatment (7 days with 1.7 mM of Si), the growth of +Si+N plants is increased by 1.45-fold compared to -Si plants. This beneficial effect of Si on plant biomass is sustainable only if plants are supplied with nitrogen (**Figure III.1.4**). To our knowledge, this work is the first to demonstrate a beneficial effect of Si on growth of unstressed plants.

Indeed, the beneficial effect of Si on growth has been shown mainly in plant species subjected to a wide range of abiotic stresses such as drought or salinity (**Eneji et al., 2008; Tuna et al., 2008; Da Cunha and Do Nascimento, 2009**). This biomass increase is associated with an increase in the amount of N in +Si+N plants (**Figure III.2D**) and with induction (by threefold) of expression of the gene that encodes the *BnaNRT2.1* nitrate transporter (**Figure III.1.3**). Considering that Si may promote cytokinin biosynthesis (**Markovich et al., 2017**) and that cytokinin is one of factors which may modulate expression of high affinity nitrate transporters (HATS) encoded by *NRT2.1* gene (**Gessler et al., 2004; Dluzniewska et al., 2006; Sakakibara et al., 2006**), root cytokinin contents have been monitored in plant pretreated with or without Si (**Figure III.1.3** and **Supplementary Table III.1.S1**). Our results show that whatever Si pretreatment (+Si or -Si), IP contents (considered as one of the main active cytokinin forms) remained at the similar level. Moreover, a decrease of trans-zeatin riboside contents was observed in roots of +Si plants. Some studies shown that only an increase of cytokinin levels is able to modulate (up- and down-regulation) *NRT2.1* gene expression (**Collier et al., 2003; Gessler et al., 2004; Sakakibara et al., 2006**). Consequently, in our study, the





induction of *NRT2.1* observed in root of +Si plant can not be explained by an increase of cytokinin levels. Thus, in this study, it can be suggested that Si may act as a signal able to induce nitrate transporter gene expression in *Brassica napus* as previously shown in corn salad where an induction of a Low Affinity nitrate Transporter (LATS) by Si has been demonstrated by **Gottardi et al. (2012)**.

Under N starvation (from Day 0 to 12), this study has shown that after days 5 and 7 the net photosynthetic activity and leaf SPAD values of +Si plants were significantly higher than -Si plants, respectively (**Figures III.1.5C,D**). In another study performed in *Zea mays* L., we have also observed a preservation of chlorophyll content in mature leaf from -N+Si plants compared to -N-Si plants (**Supplementary Figure III.1.S2**). According to **Latef and Tran (2016)** which have shown that seed-priming with Si improved photosynthetic pigment contents in leaves of maize exposed to alkaline stress, our results suggest that the beneficial effect of Si on leaf senescence induced by N starvation is not specific to *Brassica napus* L. This result is confirmed by the use of specific *Brassica napus* molecular indicators of leaf senescence (*BnaSAG12/Cab*) that showed that the progression of leaf senescence in +Si plants was shifted by 2.6 days compared -Si plants. Moreover, at Day 12, this delay of mature leaf senescence observed in +Si-N plants is associated with a significant increase of leaf IP contents (1.9-fold) comparatively to -Si-N plants (**Figure III.1.6D**). These results were in agreement with a recent work undertaken in detached leaves of *Arabidopsis thaliana* overexpressing a silicon root transporter of rice and showing that the decrease of chlorophyll degradation and delay of leaf dark-induced senescence in Si treated plants is associated with an induction of cytokinin biosynthesis and increase of leaf content of this phytohormone (**Markovich et al., 2017**). Moreover, in this study, Si pretreatment induces a significant reduction of oxidative stress markers such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA in mature leaf (**Figures III.1.6E,F**). This result is consistent with some studies showing that Si improve the antioxidant capacity and the activity in some antioxidant enzymes in different plants species subjected to abiotic or biotic stresses (**Habibi, 2016; Latef and Tran, 2016; Hasanuzzaman et al., 2017**). Thus in our study the delay of leaf senescence observed in +Si-N plant could be the consequence of the increase of leaf cytokinin content and/or by a better antioxidant capacity (**Figures III.1.6E,F**).

Surprisingly, this work has shown that when N-deprived plants were resupplied with N (days 12–21), senescing mature leaves from +Si plants recovered net photosynthetic activity



(**Figure III.1.5B**) and turned green again (**Figures III.1.5A, 6A**), while mature leaves from -Si plants continue to senesce and fall at day 16. This result is reinforced by the down-regulation of *BnaSAG12* concomitantly with up-regulation of Cab observed at day 21 in mature leaves of +Si plants (**Figure III.1.6A**), confirming a reversal of leaf senescence progression only in plants pretreated with Si. **Zimmermann and Zentgraf (2005)** have detailed the chronological events occurring during leaf senescence and have shown that the progression of this process is triphasic (i.e., initiation, reorganization and terminal phases) with both of the first phases considered as reversible in contrast to the last, which are irreversible and lead to the death and abscission of the leaf. In this study, silicon generates a delay in leaf senescence in +Si plants compared to -Si plants. Previous works have demonstrated that *BnaSAG12* gene encoding a cysteine protease was induced during early stage to late stage of leaf senescence (**Gombert et al., 2006; Desclos-Théveniau et al., 2015**). Thus, the down regulation of *BnaSAG12* in mature leaf from +Si-N plants resupplied with N suggests that leaf senescence was either in initiation or reorganization phases, i.e., in a reversible phase. In contrast, the abscission of the mature leaf from -Si-N plants resupplied with N confirms that after the duration of N starvation, leaf senescence was already engaged in the irreversible terminal phase.

Finally, during this study, it was also shown after a period of N resupply that the +Si-N plants were able to take up a greater amount of nitrogen compared to -Si-N plants (**Figure III.1.7A**). This increase in N uptake is associated with the higher root level expression of genes encoding nitrate transporters (*BnaNRT1.1* and *BnaNRT2.1*) in +Si plants (**Figure III.1.7B**). This long-term Si effect (compared to the effect observed during Si apply) may be the indirect consequence of the maintenance of photosynthetic activity, which allows the synthesis of sufficient carbohydrate substrates to regulate the number and/or activity of nitrate transporters (**Lejay et al., 2003; Feng et al., 2011**). For the *Brassica napus* crop, the benefit effect of Si supply and especially the improvement of recovery capacity after a period of abiotic stress is very interesting. Indeed, it could be suggest that Si autumnal supply could alleviate stress of plants during winter season and thus promote a better growth at the beginning of the spring and promote yield.



### III.1.E. Conclusion

This study is the first to demonstrate a beneficial effect of Si in preventing N starvation in *Brassica napus*. Indeed, in addition to a decrease of oxidative stress markers (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA) and a delay in leaf senescence during N starvation associated with an increase of leaf cytokinin content (especially IP), Si treatment is associated with reversal of this process when N nutrition conditions are again favorable. Thus, the resulting stay green effect in the leaf may allow an increase in leaf life span and promote a better synchronism between leaf senescence and seed filling (Ray et al., 1983). Indeed, many authors (Malagoli et al., 2005a; Gregersen et al., 2013) have suggested that an increase in the leaf life span of plants with low nitrogen use efficiency (such as *Brassica napus*; Avice and Etienne, 2014) may improve the remobilization of endogenous N from leaves to seeds and increase the yields of these crops.

Moreover, our study like Markovich's suggest that Si is able to act as a cellular signal able to module directly or/and indirectly gene expression. Future experiments using large-scale molecular approaches will need to be performed to explore the metabolic pathways modulated by Si and open new investigation ways.

#### Author contributions

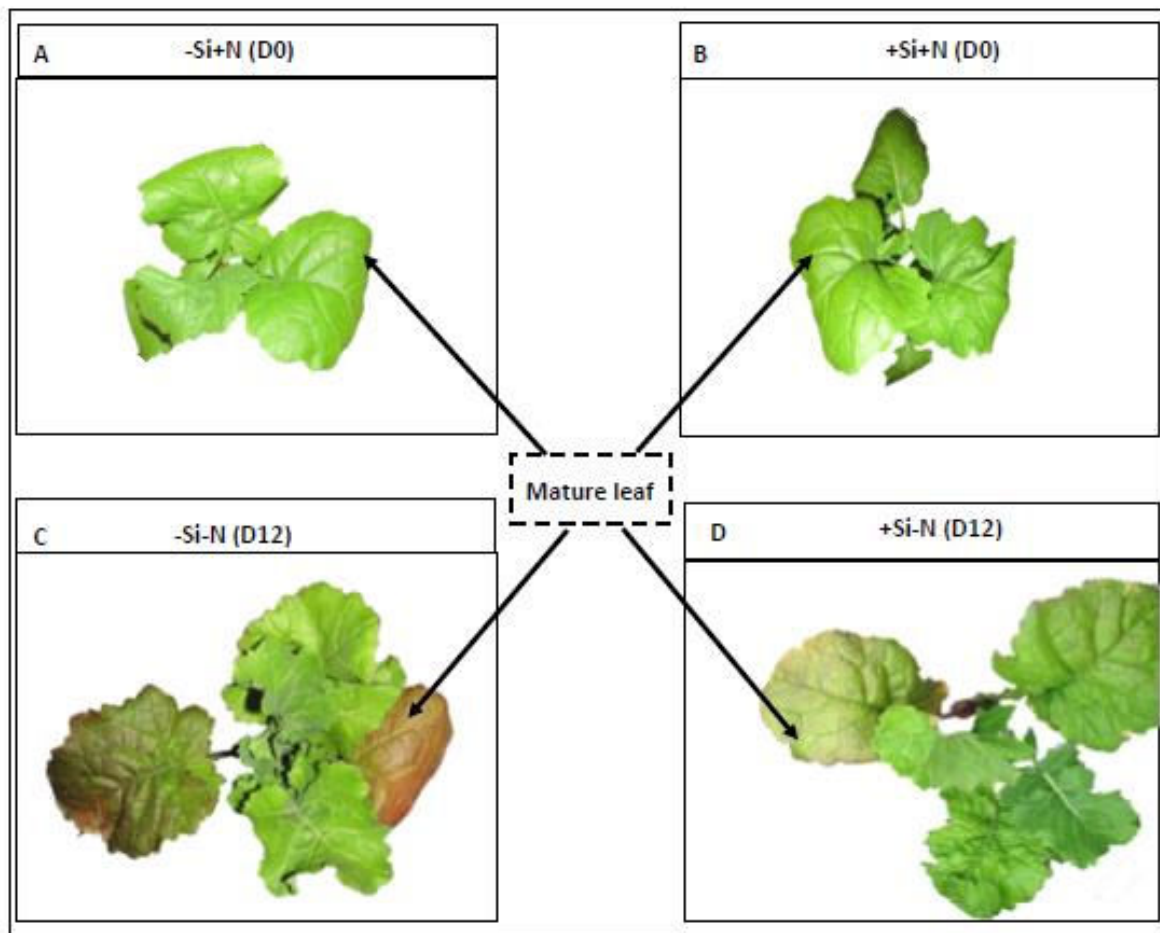
CH, PE, PL, MA, and J-CY designed the experiments. CH, PE, and PL conducted all the experiments, analyzed the data, and wrote the paper. AS and FJ performed the cytokinin analysis.

#### Funding

This research was supported by FEDER (Fonds Européen de Développement Economique Régional) and by CMI (Centre Mondial de l'Innovation Roullier).

#### Acknowledgments

We are most grateful to the PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) core facility for all the element and isotope analysis used in this study. We thank Laurence Cantrill for improving the English in the manuscript.

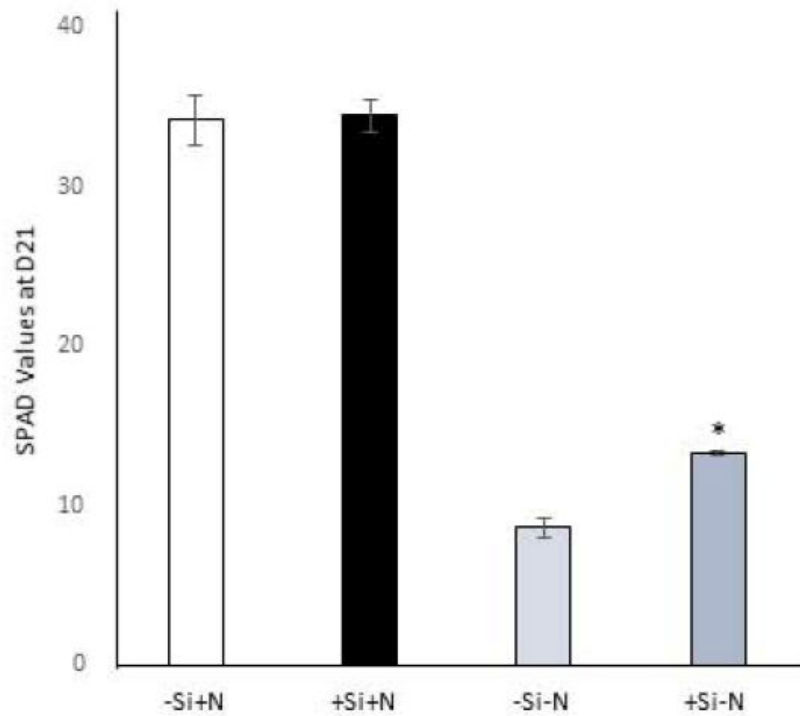


**Supplementary Figure III.1.S1: Phenotype of *Brassica napus*. L plants cultivated without (-Si+N; A) or with silicon (+Si+N; B) during one week (D0) and grown without N for 12 days (-Si-N and +Si-N; C and D). The black arrows indicate the mature leaf identified at the beginning of the N starvation (D0) and used to follow the time of course of photosynthetic activity, SPAD measurements senescence progression (*BnaSAG12/Cab*).**

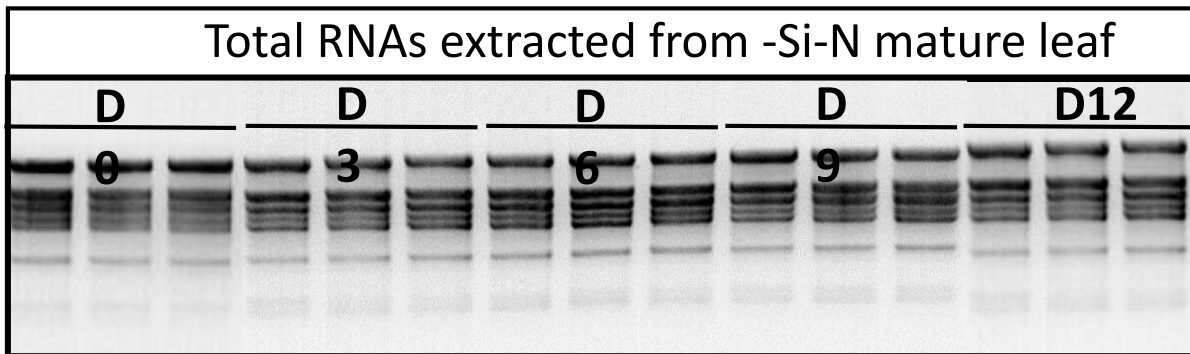
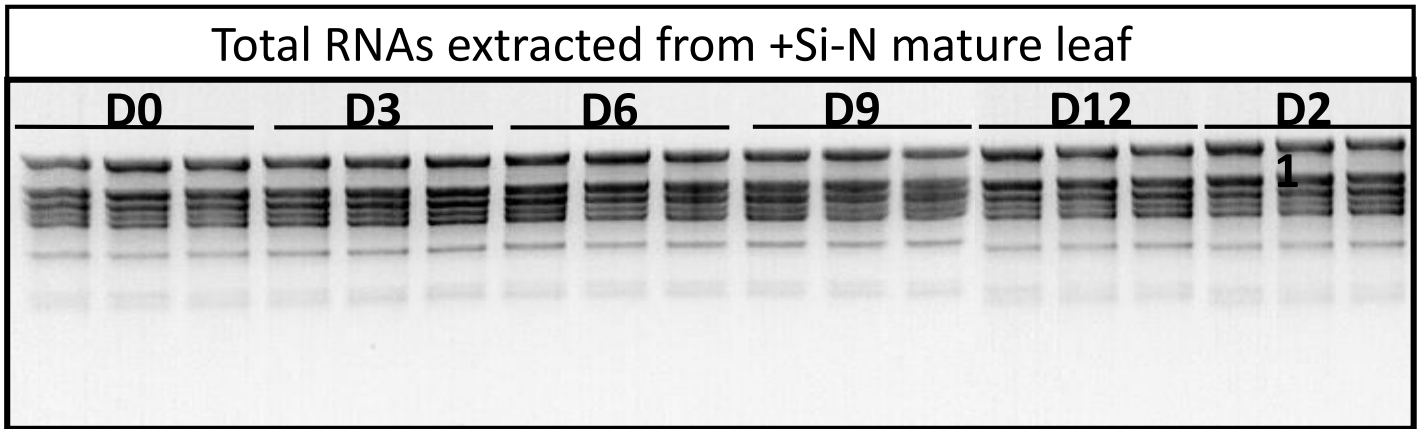
**Supplementary material**

The Supplementary Material for this article can be found online at:  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.00516/full#supplementary-material>.





**Supplementary Figure III.1.S2: Effect of Si treatment on SPAD values of mature leaf from *Zea mays* L.** Plants were pretreated with (+Si) or without (-Si) silicon during one week and supplied with (+N) or without N (-N) for 21 days. Data are means  $\pm$  SE (for n=4). \* indicates significant differences between -Si (control) and +Si plants with  $p < 0,001$ .



**Supplementary Figure III.1.S3:** Control quality of total RNAs extracted from mature leaf of N (-N) deprived plants treated with (+Si) or without (-Si). At each time (Day 0, 3, 6, 9, 12, and 21 only for +Si-N), three biological repetitions have been performed. 1  $\mu$ g of total RNAs were separated on agarose gel (1%) containing 0.5  $\mu$ g/ml of ethidium bromide (0.5  $\mu$ g/ml). After separation, agarose gels were scanned under UV light with a Gel Doc<sup>TM</sup> EZ scanner (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and visualized using ImageLab<sup>TM</sup> software (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).



---

## Chapitre III.2. Silicon supply promotes agronomic performances of *Brassica napus* cultivated under field conditions. In review in Journal of Plant Nutrition and Soil Science.

---

**Contexte:** *Brassica napus* L. est une plante oléagineuse largement cultivée pour ses nombreux débouchés alimentaires et non alimentaires. Afin d'obtenir un rendement satisfaisant, le colza requiert une quantité importante en azote (N) qui est apporté par fertilisation (140-200 Kg N ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup>). Bien que le colza soit qualifié de pompe à nitrate, il est caractérisé par une faible Efficacité d'Utilisation de l'Azote (EUA) qui en plus de limiter le rendement grainier est également à l'origine de pollutions environnementales. Compte-tenu des résultats obtenus en conditions contrôlées et montrant que le Si stimule l'absorption d'N et retarde la sénescence notamment lorsque le colza est soumis à une privation en N, des expérimentations réalisées en condition de plein champ ont été conduites afin d'évaluer les effets d'un apport de Si sur les performances agronomiques du colza.

**Objectif:** Cette étude réalisée à l'aide d'un dispositif de cases lysimétriques a pour but d'étudier l'effet d'un apport de Si (12 kg ha<sup>-1</sup>) sur les performances agronomiques du colza fertilisé avec 60 (60N) et 160 kg ha<sup>-1</sup> de N (160N).

**Démarche expérimentale:** Les plantes sont cultivées dans des cases lysimétriques avec deux niveaux de fertilisation azotée; 60 kg N ha<sup>-1</sup> et 160 kg N ha<sup>-1</sup> en présence (60N+Si ; 160N+Si) ou en absence (60N; 160N) de Si (12 kg ha<sup>-1</sup>) apporté sous forme d'acide silicique. Les plantes ont été récoltées au stade début de floraison (stade G1) et au stade de maturation des graines (stade G5).

**Résultats:** Cette étude a montré qu'un apport de Si (12 kg ha<sup>-1</sup>) n'a pas d'effet sur les performances agronomiques lorsque les plantes reçoivent une fertilisation de 60 kg ha<sup>-1</sup> d'N. En revanche, chez les plantes fertilisées avec 160 kg ha<sup>-1</sup> d'N, un apport en Si prolonge la durée de vie des feuilles au moins jusqu'au stade de la floraison (G1), améliore la croissance et le rendement en graines et leur contenu en micronutriments (en particulier Co et Fe) (Stade G5). L'utilisation d'indices agronomiques tels que l'efficacité agronomique (AE), l'indice de récolte azoté (NHI) et l'efficacité de prélèvement d'azote du sol (ANR) a montré que l'augmentation du rendement est liée à une meilleure absorption de l'N du sol par les plantes traitées au Si et non pas à une meilleure remobilisation de l'N des feuilles vers les graines

De plus, cette étude suggère que dans nos conditions de plein champ, et seulement lorsque l'azote n'est pas limitant (160N) pour la croissance des plantes, un apport de Si (12 kg ha<sup>-1</sup>) pourrait permettre une réduction de la dose de fertilisant azoté de 160 kg ha<sup>-1</sup> à environ 106 kg ha<sup>-1</sup> (soit un facteur 1,5) sans impacter le rendement et la qualité grainière du colza.



### III.2. Silicon supply promotes agronomic performances of *Brassica napus* cultivated under filed conditions

Cylia Haddad <sup>1</sup>, Mustapha Arkoun <sup>2</sup>, Jean-Claude Yvin <sup>2</sup>, Philippe Laîné <sup>1#</sup>, Philippe Etienne <sup>1#\*</sup>

# Authors with equal contribution

Adresses of institutions:

<sup>1</sup> Normandie Université, UNICAEN, INRA, UMR 950 EVA, SFR Normandie Végétal (FED4277), 14000 Caen, France

<sup>2</sup>Centre Mondial d'Innovation, Groupe Roullier, 35000 Saint Malo, France

\*Corresponding author email: philippe.etienne@unicaen.fr; phone : +33 231 565 374; fax: +33 231 565 360.

Footnotes:

Doctoral fellowship co-funded by European Union, Normandy County Council, in the framework of the ERDF-ESF operationnal programme 2014-2020 and the CMI group Roullier.

**Key words:** Agronomic indexes, rapeseed, micronutrients, silicon, yield.



## Abstract

To limit the environmental pollution associated with intensive N fertilizer use, the development of alternative practices must be considered in particular for crops requiring high N inputs as rapeseed. In this context, effects of Si supply on agronomic performances of *Brassica napus* cultivated in field conditions with two nitrogen (N) fertilizer levels (60 and 160 kg N ha<sup>-1</sup>) were studied.

This study showed that a Si supply (12 kg Si ha<sup>-1</sup>) has no effect on agronomic performances of plants cultivated with the lower N input (60N). In contrast, in plants fertilized with 160 kg N ha<sup>-1</sup>, positive effects of Si supply were observed on preservation of green leaves at least until flowering stage and at the final stage, on growth, on seed yield and seed micronutrient concentrations (especially Co and Fe). The use of agronomic indexes such as agronomic efficiency, nitrogen harvest index and agronomic nitrogen recovery showed that the increase of seed yield is related to a better uptake of N from the soil by Si treated plants but not from an improvement of N mobilization towards seeds.

Moreover, this study suggest that in our field conditions and only when N is not limiting for plant growth, a Si supply could allow to reduce the N input by around 1.5 fold (from 160 kg N ha<sup>-1</sup> to around 106 kg N ha<sup>-1</sup>) without impact on seed yield.

Taken together, all these results showed that a Si supply combined with non-limiting N inputs (160N) improves N uptake efficiency and lead to an increase of yield. Furthermore, this Si supply promotes also a biofortification of *Brassica napus* seeds especially by increasing Co and Fe seed allocations.

## Abbreviations

HR ICP-MS: High-Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry; IRMS: Isotope-Ratio Mass Spectrometry; NIRS: Near Infra-Red System.

### III.2.A. Introduction

Silicon (Si) is the second most abundant element in the soil after oxygen and reaches about 28 % of the earth's crust (**Ma and Yamaji, 2006; Sommer et al., 2006**). Si is mainly present in soil as crystalline aluminosilicates, an insoluble form and not directly available for plants (**Epstein and Bloom, 2005**). In contrast, silicic acid [Si(OH)<sub>4</sub>] is the soluble form of silicon in soil solution ranging from 0.1 to 0.6 mM (**Epstein, 1994**), Si is taken up by plants using specific root transporters (Lsi1; **Ma et al., 2006**). Vascular plant species have different ability to take





up and accumulate Si leading to define 3 groups classified in function of Si concentration: “strong accumulators” with a Si content reaching 15% of DW (as rice), “intermediate accumulators” with a Si content comprised between 1–3% of DW (as rye, oats, or wheat), and finally) “weak Si accumulators” such as rapeseed with a Si content less than 0.1% of DW (**Jones and Handreck, 1967; Epstein, 1999; Broadley et al., 2012, Haddad et al., 2018**). Although silicon is not considered as an essential element for higher plants, several beneficial effects have been shown especially in plants against various biotic and abiotic stresses. For example, Si application reduces the severity of fungal diseases such as powdery mildew in barley (**Ma et al., 2001**) and other diseases such as blast and brown spot in rice (**Datnoff et al., 1997; Rodrigues et al., 2003**). Moreover, some studies have shown that Si supply improves the plant tolerance to toxic metals such as Cd, Al and Cr (**Nhan and Hai, 2013; Zhang et al., 2013b**) and to salt stress (**Farshidi et al., 2012**). Furthermore, a recent study has shown a beneficial effect of Si supply to alleviate damage associated with nitrogen (N) starvation in rapeseed, a plant species even considered as a weak Si accumulator. More precisely, this study shown that Si supply promotes a better N uptake associated with an induction of nitrate transporters, induces a delay of leaf senescence during N starvation and a greening of senescent leave when N was resupply (**Haddad et al., 2018**). These results showing an increase of leaf life span were particularly interesting since rapeseed is characterized by a low N use efficiency (**Malagoli et al., 2005a; Avicé and Etienne, 2014**). Indeed, **Malagoli et al. (2005b)** using a modelling approach have shown that an increase of leaf life span by 15% could allow to a better synchronism between N leaf remobilization and N seed filling leading to an improvement of seed yield (+15%).-Taken together, these data suggest that a Si supply could improve N management of *Brassica napus* and allow to reduce the high N inputs required for this crop (160-250 Kg N ha<sup>-1</sup>) to ensure it seed production (**Rathke et al., 2005**).

In this context, the aim of this study was to investigate the effect of silicon supply (12 kg Si ha<sup>-1</sup>) on agronomic performances of rapeseed cultivated under field conditions and fertilized with high (160 kg N ha<sup>-1</sup>) and low (60 kg N ha<sup>-1</sup>) N inputs. Firstly, the effect of a Si supply on whole plant biomass and leaf senescence has been studied at flowering stage. Secondly, the effect of Si supply on agronomic performances through the of yield component measurement, analysis of seed quality and the calculation of N use efficiency indexes such as

**Supplementary Table III.1.S1:** Detail of cytokinin contents (expressed in  $\mu\text{g mg}^{-1}$  DW) in roots and shoots, (D0) and in mature leaf and roots (D12) of *Brassica napus* L. plants pretreated with (+Si) or without (-Si) silicon for one week and supplied with (-Si+N; +Si+N) or without (-Si-N; +Si-N) nitrogen for 12 days (from D0 to D12). Data are means  $\pm$  SE (for n=3). \* and \*\* indicate significant differences (in bold) between -Si and +Si plants with  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively. IP:  $\text{N}_6$ -Isopentenyladenine; t-Z: Trans-zeatin; IPAdo:  $\text{N}_6$ -Isopentenyladenosine.

Harvest time	Organ	Treatment	IP ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ DW)	t-Z ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ DW)	IPA do ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ DW)
D0	Shoots	-Si (Control)	0.015 $\pm 0.002$	0.010 $\pm 0.002$	0.025 $\pm 0.001$
		+Si	0.012 $\pm 0.001$	0.007 $\pm 0.001$	0.021 $\pm 0.002$
	Roots	-Si (Control)	0.097 $\pm 0.001$	<b>0.043</b> $\pm 0.002^*$	0.369 $\pm 0.009$
		+Si	0.102 $\pm 0.001$	<b>0.020</b> $\pm 0.001$	0.328 $\pm 0.011$
D12	Mature leaf	-Si+N	0.028 $\pm 0.001^*$	0.059 $\pm 0.016$	0.046 $\pm 0.006$
		+Si+N	0.018 $\pm 0.001$	0.017 $\pm 0.000$	0.033 $\pm 0.000$
		-Si-N	<b>0.012</b> $\pm 0.001^{**}$	0.055 $\pm 0.024$	0.199 $\pm 0.104$
		+Si-N	<b>0.022</b> $\pm 0.001$	0.040 $\pm 0.018$	0.225 $\pm 0.176$
	Roots	-Si+N	0.095 $\pm 0.001$	0.012 $\pm 0.001$	<b>0.303</b> $\pm 0.013^{**}$
		+Si+N	0.090 $\pm 0.002$	0.014 $\pm 0.001$	<b>0.414</b> $\pm 0.024$
		-Si-N	0.056 $\pm 0.002$	0.007 $\pm 0.001$	0.101 $\pm 0.001$
		+Si-N	0.042 $\pm 0.001$	0.006 $\pm 0.000$	0.059 $\pm 0.003$

Nitrogen Harvest Index (NHI) Agronomic Efficiency (AE) and Agronomic Nitrogen Recovery (ANR).

### III.2.B. Materials and methods

#### a. Site, climatic conditions and lysimeter description

The field experiment was performed from September 2016 to July 2017 using lysimeter system located at Lieury, in the north of France (00° 00' 34.3" W, 48° 59' 24.2" N). The lysimeter device was composed of 15 polyester resin lysimeter boxes with an area of 1.96 m<sup>2</sup> (1.4 m x 1.4 m), and a depth is 1.10 m. Rain-fall and air temperature were measured continuously at a meteorological station at the Lycée Le Robillard in Lieury (Calvados, France; **Figure III.2.1**). The mean minimum and maximum air temperatures were 5.86 and 16.23 °C, respectively, and total precipitations reached 508.2 mm during the period of rapeseed cultivation (2016–2017).

Each lysimeters box was filled with a Calcaric Cambisol arable soil (World Reference Base for soil resources, 2006) with 4.3 % of organic matter in 0-20 cm, a basic pH and a calcium carbonate content which increases with the depth (**Table III.2.1**).

#### b. Experimental design

Seeds of rapeseed (*Brassica napus* L. 'Citizen') were sown on 17 September 2016 as previously described by Génard et al. (2017). At stage B4 (*i.e.* after the appearance of 4 first leaves), young plants were carefully transplanted into the lysimeters, with a density of 60 plants per lysimeter. At stage C1 (rosette stage; March 17, 2017), the 15 lysimeters boxes were separated into five batches (each batch was composed of 3 lysimeters boxes; **Figure III.2.2**). All lysimeters were fertilized with phosphorus (P: 40 kg P ha<sup>-1</sup> in form of P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), potassium (K: 50 kg K ha<sup>-1</sup> in form of K<sub>2</sub>O) and sulfur (30 kg K ha<sup>-1</sup> in form of MgSO<sub>4</sub>). Among them, three used as 0N controls did not receive N fertilization (**Supplementary Figure III.2.S1**). On the twelve remaining boxes, two N fertilization levels (60 and 160 Kg N ha<sup>-1</sup>) were supplied in form of ammonium nitrate fractioned in two inputs (30 or 80 Kg N ha<sup>-1</sup> at March 17, 2017 and 30 or 80 Kg N ha<sup>-1</sup> at March 31, 2017 (stage E)). Finally, half of 60 and 160N lysimeters was supplied with 12 kg of Silicon ha<sup>-1</sup> (60N+Si and 160N+Si) in form of Si(OH)<sub>4</sub> fractioned in 4 inputs: 1 kg ha<sup>-1</sup> in stage C1 (March 17, 2017), 1 kg ha<sup>-1</sup> in stage E (bolting stage, March 31, 2017), and two inputs of 5 kg ha<sup>-1</sup> during stage F (flowering stage, April 7 and 25, 2017). In contrast, the other

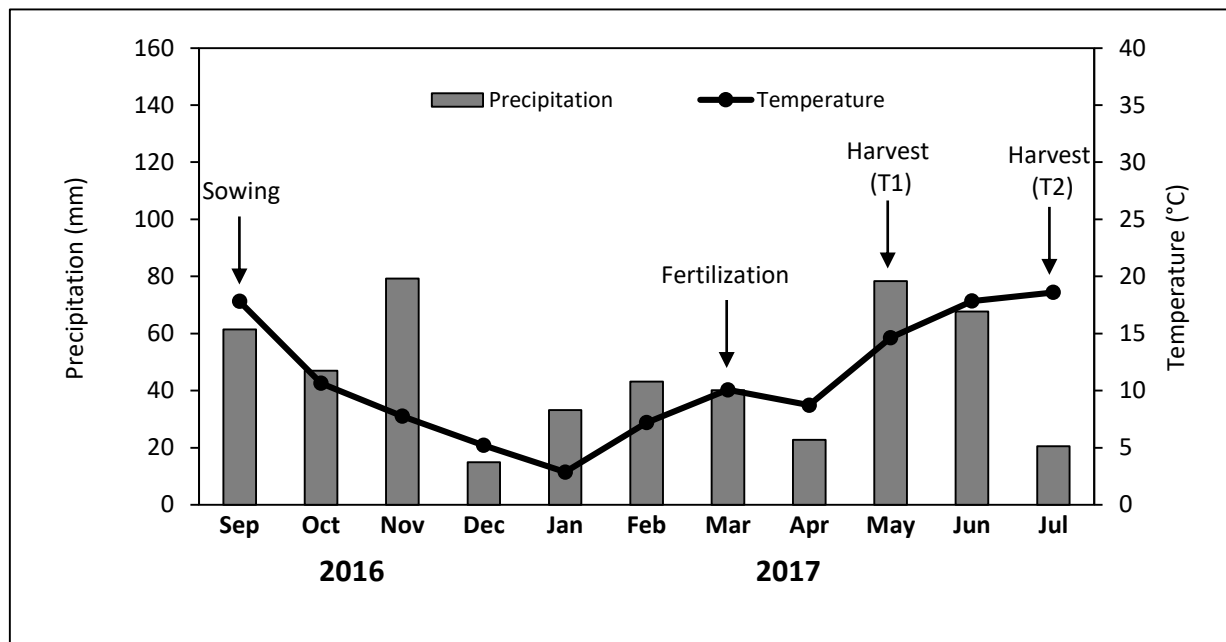


Figure III.2.1: Mean monthly temperature and precipitation recorded at the meteorological station during the 2016–2017 growth season. Arrows indicated main experimental steps .

Table III.2.1: Physical and chemical characteristics of the soil in the lysimeters. nd: non-detected value

Depth (cm)	Particle size distribution (%)			pH (Water)	Total S (mg S g <sup>-1</sup> )	Organic C (mg C g <sup>-1</sup> )	Total N (mg N g <sup>-1</sup> )	Inorganic N (µg N g <sup>-1</sup> )	C : N ratio	CEC (mol kg <sup>-1</sup> )	CaCO <sub>3</sub> (%)
	Sand	Silt	Clay								
0-20	32	38	30	7.9	0.1	25.4	3.2	7.4	7.9	16.5	10
20-40	34	38	28	8.1	0.1	15.0	1.9	7.5	8.0	11.5	12
40-65	41	35	24	8.3	0.1	7.6	0.9	4.5	8.2	7.2	28
65-100	49	34	17	8.4	nd	3.4	0.4	4.7	8.5	4.6	38

half of 60N and 160N lysimeters were considered as control of Si supply (60N and 160N) and did not receive Si inputs (**Figure III.2.2**).

For all treatments, plants cultivated on half lysimeter area (*i.e.* 30 plants corresponding to 1 m<sup>2</sup>) were harvested at stage G1 (rosette stage; harvest T1, May 16, 2017) and at G5 stage (ripening stage; harvest T2, July 07, 2017). At each harvest date, plant organs (taproot, stem, leaves), and pods (T2)) were separated, weighted and dried oven for 48 hours at 60°C for dry weight (DW) determination and then ground to fine powder in order to perform elemental analyzes.

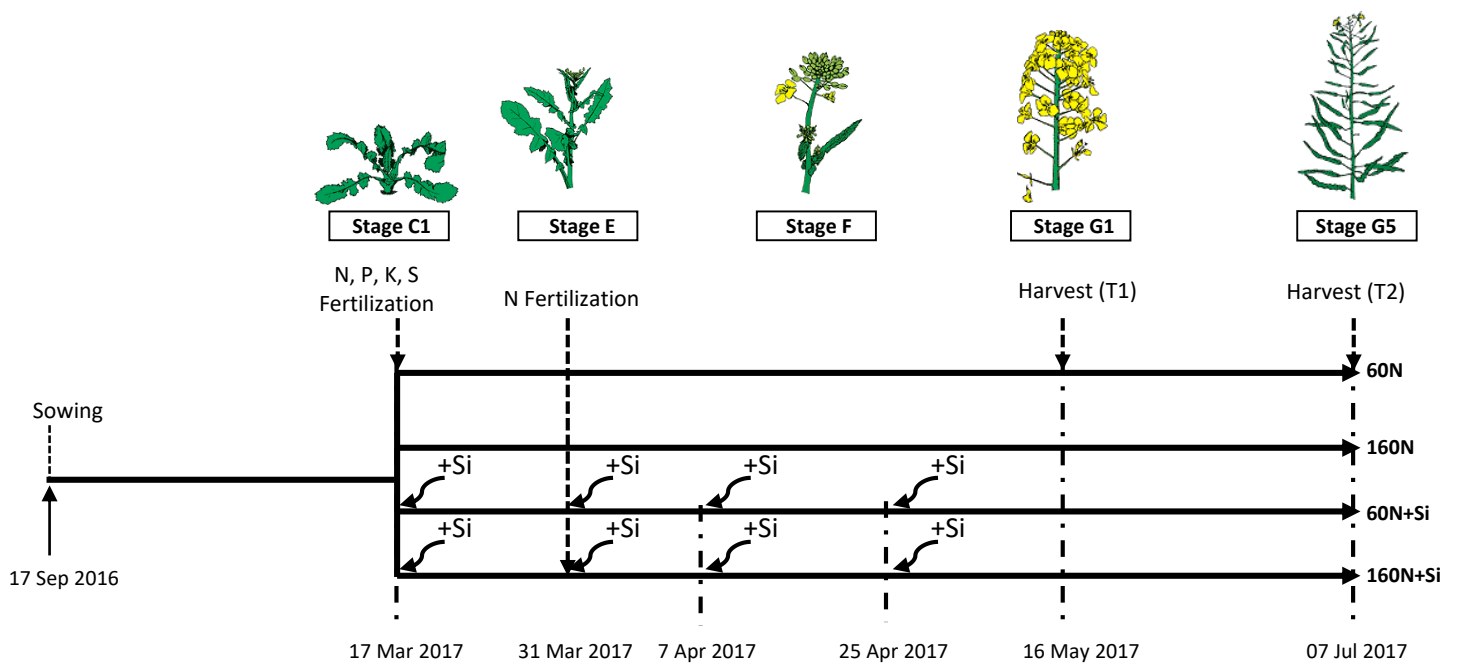
#### **c. Determination of percentage of green and senescent leaf**

At harvest T1, all leaves present on plants were collected and total leaf dry weight (TLDW) was determined. Then, leaves were separated in fully green leaves (FGL without yellow area) and senescent leaves (SL) characterized by visual yellow area and dry weight of each batch is determined (FGLDW and SLDW, respectively). For each treatment, the percentage of green or senescent leaves on plants was calculated as follow: [(FGLDW or SLDW)/TLDW] x 100.

#### **d. Elemental analysis**

For N analysis, an aliquot of each dried sample (pericarps, seeds, taproots, stem and leaves of plants at T2) was placed into tin capsules using a microbalance and the total N concentration was determined with a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (Horizon, NU Instruments, Wrexham, United Kingdom) linked to a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy).

In mature seeds, macro (N, P, K, S, Ca, Mg) and micronutrients (Zn, Mn, B, Cu, Mo, Se, Cd, Ni, Fe, Co) were quantified by high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry (HR ICP-MS, Thermo Scientific, Element 2™) with prior microwave acid sample digestion (Multiwave ECO, Anton Paar, les Ulis, France) performed with 800 µl of concentrated HNO<sub>3</sub>, 200 µl of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 1 ml of Milli-Q water for 40 mg DW. All samples were spiked with three internal standards solution containing gallium, rhodium and iridium with final concentrations of 5, 1 and 1 µg l<sup>-1</sup>, respectively. Then, all samples were diluted with 50 ml of Milli-Q water to obtain solutions containing 2.0% (v/v) of nitric acid. Before analysis with HR ICP-MS, these solutions were filtered at 0.45 µm using a teflon filtration system (Digifilter, SCP Science, Courtaboeuf, France). Quantification of each element was performed using external standard



**Figure III.2.2: Experimental design used to study the effect of silicon (Si) on the agronomic performance of *Brassica napus* L. cultivated into lysimeter boxes.** When plants were at stage C1 (March 17, 2017), fertilization combining nitrogen (N: 30 or 80 kg ha<sup>-1</sup> for 60 and 160 N treatments, respectively), phosphorus (P: 50 kg ha<sup>-1</sup>), potassium (K: 50 kg ha<sup>-1</sup>) and sulfur (S: 30 kg ha<sup>-1</sup>) was applied. At stage E (March 31, 2017), a second N fertilization with 30 or 80 kg N ha<sup>-1</sup> was applied for 60 and 160 N treatments, respectively. In addition, for each N treatment (60 and 160 N), a silicon fertilization (Si: 12 kg ha<sup>-1</sup> in form of Si(OH)<sub>4</sub>) is applied in 4 times (March 17; 31 and April 7; 25, 2017: 60N+Si and 160N+Si) or not (Controls: 60N and 160 N). For all treatments, plants were harvested at T1 and T2 corresponding to G1 and G5 stages, respectively.

calibration curves and concentrations were expressed in  $\text{mg g}^{-1}$  and  $\mu\text{g g}^{-1}$  of seed DW for macro and micronutrients, respectively.

**e. Determination of oil, protein and glucosinolate concentrations in mature seeds with Near Infrared Spectroscopy (NIRS)**

Five g of seed samples were scanned on a monochromator Near InfraRed System (model 65000, FOSS NIRSystem Inc., Silver Spring, MD, USA) equipped with the transport module in the reflectance mode. The results were predicted from an external calibration established for oil, protein and total glucosinolate (GLS) concentrations (CRAW, Gembloux, Belgium). Oil and proteins concentrations were expressed in % of seed dry matter (DW) and GLS (glucosinolates) concentrations were expressed in  $\mu\text{g g}^{-1}$  of seed DW.

**f. Determination of nitrogen use efficiency indexes**

Agronomic efficiency (AE), nitrogen harvest index (NHI) and agronomic nitrogen recovery (ANR) were calculated to characterize the nitrogen use efficiency of *Brassica napus* crop fertilized with two levels of N inputs (60 or 160N) and supplied or not with Si.

AE which represents the efficiency of the crop to convert applied nitrogen to seed yield was calculated as follow:

$$AE = [(SW \text{ with fertilizer}_{(60N, 60N+Si, 160N \text{ or } 160N+Si)} - SW \text{ without fertilizer}_{(0N)}) / Nf_{(60 \text{ or } 160N)},$$

where SW and Nf correspond to seed weight and nitrogen supply by fertilizer, respectively. Value of SW without fertilizer  $_{(0N)}$  was described in **Supplementary Figure III.2.S1**.

ANR defined as the efficiency of capture of nitrogen from soil was calculated as follow:

$$ANR = [(Nt \text{ with fertilizer} - Nt \text{ without fertilizer}) / Nf] \times 100,$$

where Nt and Nf correspond to total nitrogen in plant and nitrogen supply by fertilizer, respectively. Nt without fertilizer was determined as the addition of vegetative and seed N amounts shown in **Supplementary Figure III.2.S1**.

NHI which represents the efficiency of nitrogen mobilization towards the seeds was calculated using the following equation:

$$NHI = [NS_{(60N, 60N+Si, 160N \text{ or } 160N+Si)} / Nt_{(60N, 60N+Si, 160N \text{ or } 160N+Si)}],$$





where  $N_s$  and  $N_t$  correspond to total N in seed and in whole 60N or 160N plants supplied (60N+Si or 160N+Si) or not (60N or 160N) with Si, respectively.

### g. Statistical analysis

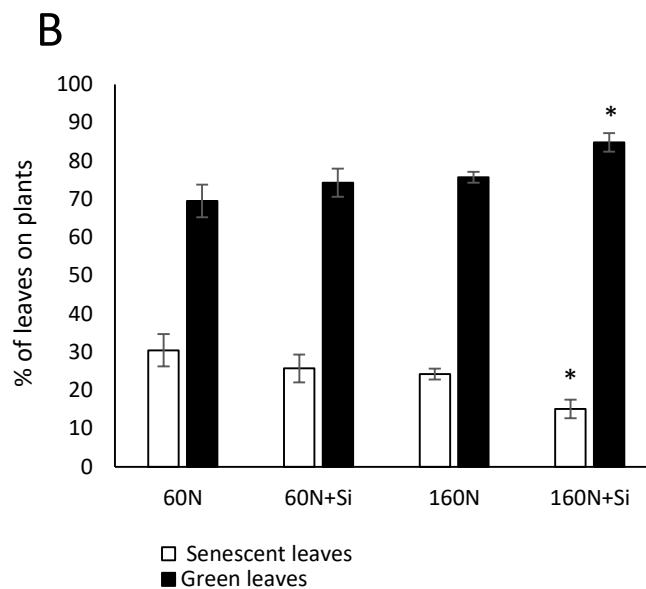
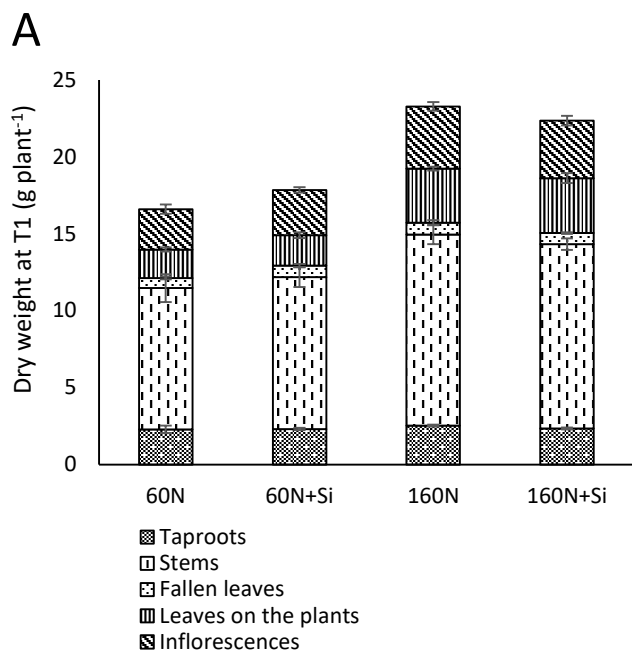
Results are reported as means  $\pm$  standard errors (SE) for  $n=3$ . All statistical analyses were performed with the software Microsoft® Excel 2010/XLStat® 2016. Analysis of variance were conducted using Student test after verifying compliance of normality of the data and homogeneity of variance using the Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively .

## III.2.C. Results

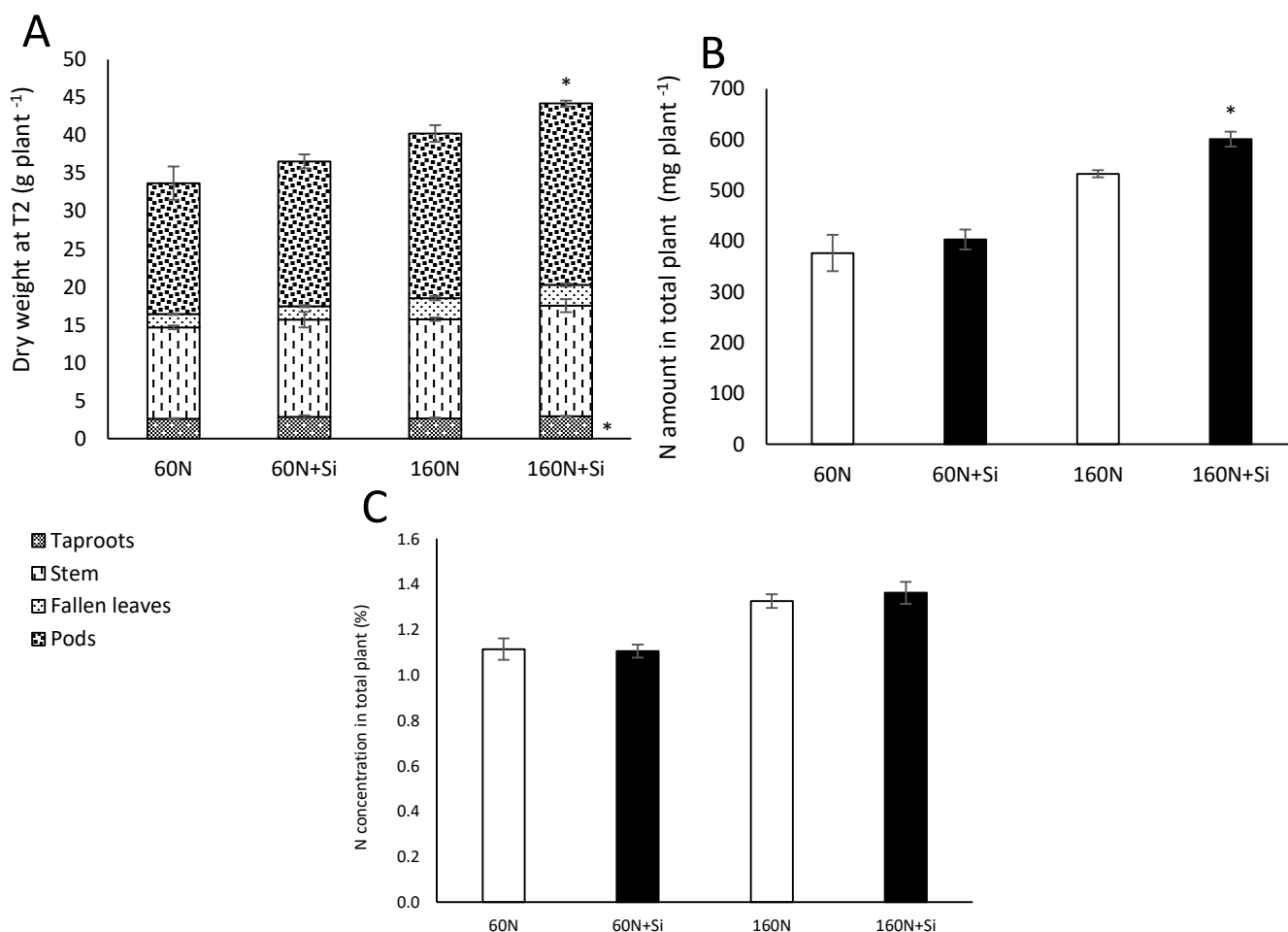
### a. Effect of silicon supply on plant growth and leaf development

At the developmental stage G1 (*i.e.* flowering, harvest T1) of *Brassica napus*, for a given level of nitrogen fertilization (60 or 160 kg N ha<sup>-1</sup>), silicon supply (12 kg Si ha<sup>-1</sup>) has no effect on biomass of different compartments and on total biomass of plants. Thus, cumulative biomasses of plants were 18.91.0 $\pm$ 1.74, 18.47 $\pm$ 0.95, 24.18 $\pm$ 1.24 and 25.46.0 $\pm$ 1.33 g plant<sup>-1</sup> for 60N, 60 N+Si, 160N and 160N+Si plants, respectively (**Figure III.2.3A**). Moreover, for plants cultivated with 60 kg N ha<sup>-1</sup>, Si supply has no effect on the distribution of green (69.5 and 74.2% for 60N and 60N+ Si, respectively) and senescent leaves (30.5 and 25.8% 60N and 60N+Si, respectively). In contrast, for plants cultivated with 160 kg N ha<sup>-1</sup>, the distribution of green and senescent leaf is significantly different in plants treated by Si (160+Si) compared to control (160N). Thus, in plants cultivated with 160N, Si supply increases the percentage of green leaves (84.9% *versus* 75.7% in 160N+Si and 160N, respectively plants) and decreases percentage of senescent leaves (15.1% *versus* 24.3% in in 160N+Si and 160N plants, respectively) (**Figure III.2.3B**).

At the developmental stage G5 (stage corresponding to mature seeds, harvest T2), Si supply has no effect on total plant and compartments biomasses of plants cultivated with 60 N. In plants cultivated with 160N, Si supply leads to an increase of taproot biomass (2.94 $\pm$ 0.03 g plant<sup>-1</sup> *versus* 2.67 $\pm$ 0.09 in 160N+Si and 160N plants, respectively) and whole plant biomass (45.13 $\pm$ 0.73 g plant<sup>-1</sup> *versus* 40.23 $\pm$ 1.33 g plant<sup>-1</sup> in 160N+Si and 160N plants, respectively) (**Figure III.2.4A**). Moreover, total N amount in 160N+Si plants is significantly higher than in 160N plants while Si supply have no effect on N amount of plant cultivated with 60N (**Figure III.2.4B**). However, it can be underlined that the increase of N amount in 160N+Si plant is not



**Figure III.2.3: Compartment and total biomasses (DW; A) and percentage of green and senescent leaves (B) of rapeseed plants harvested at T1 (G1 stage).** Plants were grown in lysimeter with 60 (60N) or 160 kg of N ha<sup>-1</sup> (160N) and supplied with or without Si (12 Kg ha<sup>-1</sup>: 60N+Si and 160N+Si). Values correspond to mean  $\pm$  SE for n=3. The data obtained from plants treated with silicon (60N+Si and 160N+Si) were compared to their respective control using the Student t test and \* indicated significant difference at p<0.05.



**Figure III.2.4: Compartment and total biomasses (DW; A), total nitrogen amount (B) and N concentration (C) in rapeseed plants harvested at T2 (G5 stage).** Plants were grown in lysimeter with 60 (60N) or 160 kg of N ha<sup>-1</sup> (160N) and supplied with or without Si (12 Kg Si ha<sup>-1</sup>: 60N+Si and 160N+Si). Values correspond to mean  $\pm$  SE for n=3. The data obtained from plants treated with silicon (60N+Si and 160N+Si) were compared to their respective control using the Student t test and \* indicated significant difference at p<0.05.

link to an increase of N concentration (**Figure III.2.4C**) but to an increase of total biomass (**Figure III.2.4B**).

#### **b. Effect of silicon supply on yield and seed quality components**

Si supply has no effect on yield of plants cultivated with 60N while it leads to a significant increase of yield of plants cultivated under 160N. Thus, the yield of 160N+Si plants reaches  $4247.20 \pm 75.23$  versus only  $3644.37 \pm 182.48$  kg ha<sup>-1</sup> for 160N plants. Moreover, a Si supply has no effect on quality components including the thousand seed weight, glucosinolate, oil and protein concentrations of seeds from 60N and 160 N plants (**Table III.2.2**).

#### **c. Effect of silicon supply on elemental seed composition**

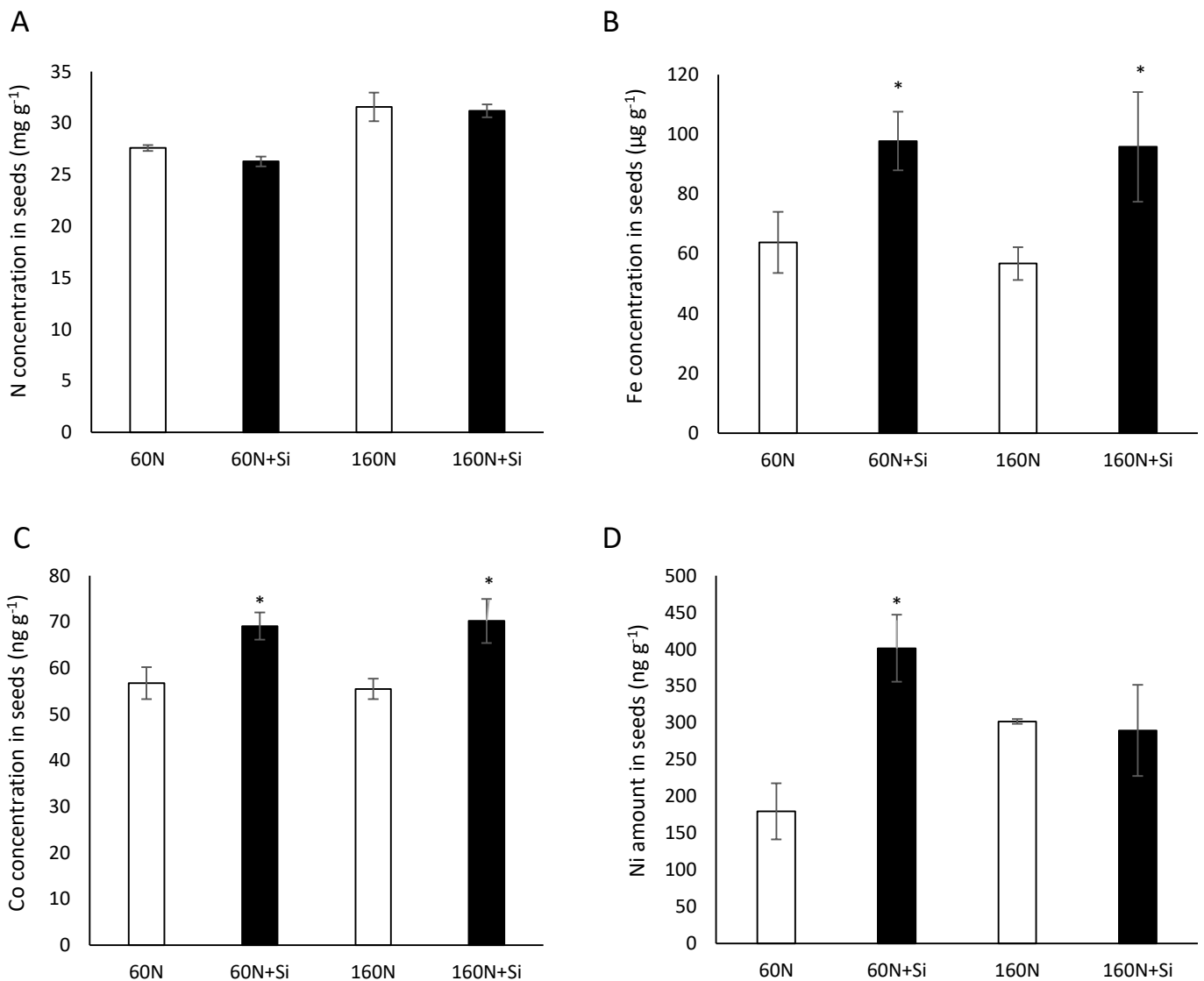
Using ICPMS method, concentrations of 6 macronutrients (N, P, K, S, Ca, Mg) and 10 micronutrients (Zn, Mn, B, Cu, Mo, Se, Cd, Ni, Fe, Co) has been analyzed in seeds from plants cultivated with 60 or 160 N and supplied with or without Si. For a given N fertilization, Si supply has no effect neither on N concentration of seeds (**Figure III.2.5A**) neither on seed concentrations of other macronutrients (P, K, S, Ca, Mg; **Supplementary Table III.2.S1**). Among micronutrients, Co and Fe concentrations increase in seeds of plants supplied with Si (60N+Si and 160N+Si) compared to their respective controls (60N and 160N). Moreover, Si supply leads to Ni concentration increase by 2.23 folds only in seeds of plants cultivated with 60N (**Figures III.2.5B and III.2.5C**). For the seven other micronutrients, Si supply did not modify their concentrations in seeds from plant whatever the N fertilization input (**Supplementary Table III.2.S1**).

#### **d. Effect of silicon on nitrogen use efficiency components of plants**

For 60 N plants cultivated with or without Si supply, no significant difference was observed for agronomic efficiency (Fig. 6A), apparent nitrogen recovery (**Figure III.2.6B**) and nitrogen harvest index (**Figure III.2.6C**) and for residual N concentration in fallen leaves (**Figure III.2.6D**). In contrast, when plants were cultivated with 160N, a Si supply lead to an increase of agronomic efficiency and ANR by 1.5 and 1.3 folds, respectively. In add, in these plants, Si supply did not improve neither the nitrogen harvest index neither the N residual concentrations in fallen leaves from these plants. Moreover, it can be noticed that the residual N concentrations in fallen leaves from plants cultivated under 60N (60N and 60N+Si) is

**Table III.2.2: Yield component, concentration of oil, protein and glucosinolate concentrations and linoleic acid (w-6): linolenic acid (w-3) ratio (w-6:w-3 ratio) in mature seeds from rapeseed cultivated with 60 (60N) or 160 kg of N ha<sup>-1</sup> (160N) and supplied with or without Si (12 Kg ha<sup>-1</sup>: 60N+Si and 160N+Si). Values correspond to mean ± SE for n=3. The data obtained for seeds from plants treated with silicon (60N+Si and 160N+Si) were compared to their respective control using the Student t test and \* indicated significant difference at p<0.05.**

	Yield (kg ha <sup>-1</sup> )	Thousand-seed weight (g)	Glucosinolate concentration (µg g <sup>-1</sup> DW)	Oil concentration (% DW)	w6:w3 ratio	Protein concentration (% DW)
60N	2696.96±217.90	5.27±0.33	13.10±0.85	49.70±0.96	2.37±0.27	14.77±0.13
60N+Si	3122.13±74.37	4.92±0.21	15.43±0.55	50.45±0.55	2.42±0.13	14.58±0.45
160N	3644.37±182.48	4.81±0.40	17.97±0.66	47.4±0.67	2.48±0.06	16.50±0.10
160N+Si	4247.20±75.23 *	4.54±0.28	16.53±1.54	47.93±0.42	2.24±0.10	17.33±0.26

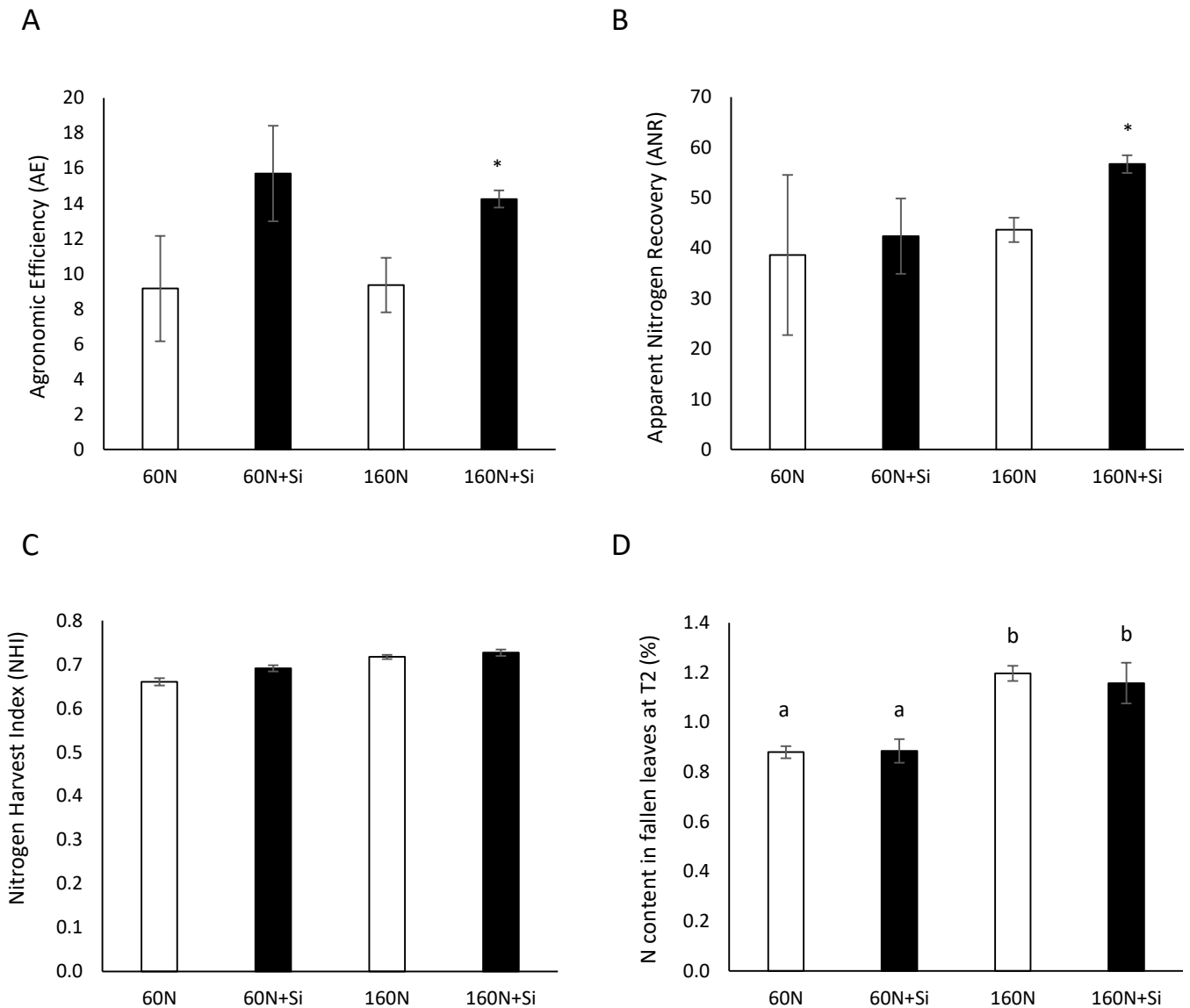


**Figure III.2.5: Nitrogen (A), Iron (B), Cobalt (C) and Nickel (D) concentrations in mature seeds of plants harvested à T2 (G5 stage). Plants were grown in lysimeter with 60 (60N) or 160 kg of N ha<sup>-1</sup> (160N) and supplied with or without Si (12 Kg ha<sup>-1</sup>: 60N+Si and 160N+Si). Values correspond to mean ± SE for n=3. The data obtained from plants treated with silicon (60N+Si and 160N+Si) were compared to their respective control using the Student t test and \* indicated significant difference at p<0.05.**

significantly lower than those in fallen leaves from 160 N plants (160N and 160N+Si) and reach about 0.9 and 1.2 %, respectively (**Figure III.2.6D**).

### III.2.D. Discussion

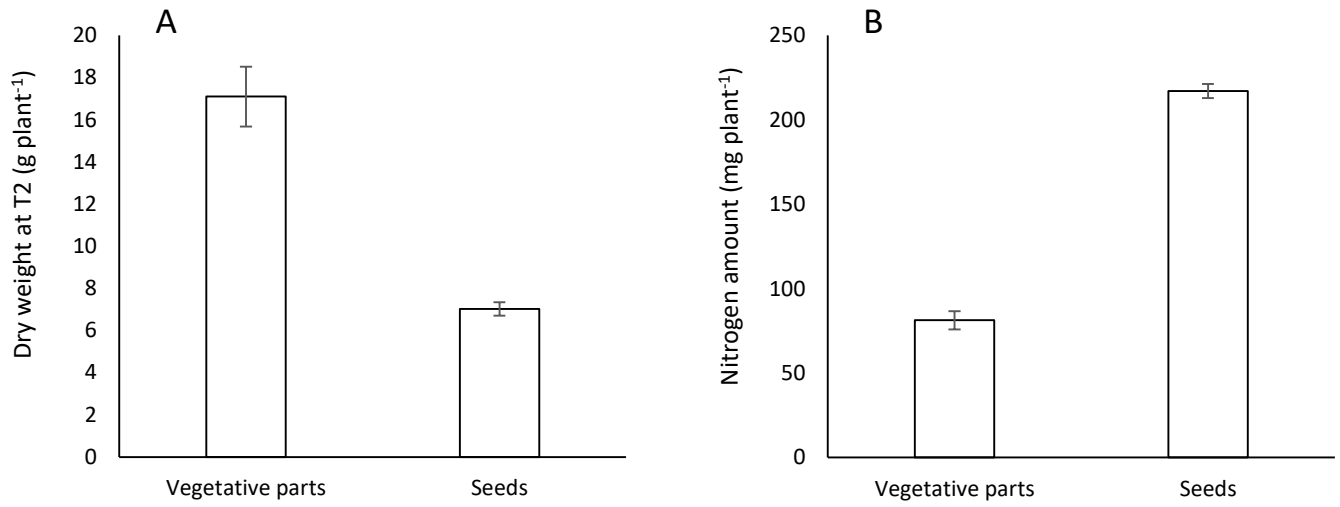
For the lower nitrogen inputs (60 kg N ha<sup>-1</sup>), whatever the developmental stage studied (flowering and final stages), a Si supply (12 Kg Si ha<sup>-1</sup>) has no effect on the growth, yield and seed quality of rapeseed cultivated in field conditions (**Figures III.2.3** and **III.2.4A**; **Table III.2.2**). This result suggest that the supply of beneficial micronutrient such as Si is not relevant to promote development of plant facing to a low availability of an essential macronutrient as N (**Good et al., 2004**). When plants where cultivated with a higher N input, Si increases the percentage of green leaves on plants at flowering stage (harvest T1) compared to control plants (84.85% and 75.73% in 160N+Si and 160N, respectively) (**Figure III.2.3**). This result is in agreement with previous studies showing that Si supply delays leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*, *Sorghum bicolor* and *Brassica napus* cultivated in controlled conditions (**Markovich et al., 2017**; **Haddad et al., 2018**). Moreover, at final stage of development, Si supply lead to an increase of whole plant biomass, especially due to an increase of root and seed biomasses, related to an increase of N amount (+12.8%) in +Si plants (**Figures III.2.4B** and **III.2.4C**; **Table III.2.2**). These results suggest that the Si supply stimulates N uptake throughout an increase of root biomass allowing a better N prospection of soil and/or an induction of root expression of genes encoding nitrate transporters (NRT2.1 and NRT2.2) as previously shown in several studies (**Gottardi et al., 2012**; **Haddad et al., 2018**). As previously suggested by **Haddad et al. (2018)**, the preservation of photosynthetic capacity associated with the delay of leaf senescence observed in 160N+Si may explain both the increase of expression of these genes and the increase of whole plant biomass. Moreover, the increase of N uptake in 160N+Si is also reinforced by the determination of Agronomic Nitrogen Recovery (ANR) translating that the efficiency of plants to pick up N from soil is improved. Indeed, ANR determined for 160N+Si plants is significantly higher than it calculated for 160N plants (from 57 to 43%). This better N uptake leads to an increase of seed yield of 160N+Si (4.2 T ha<sup>-1</sup>) compared to 160N plants (3.6 T ha<sup>-1</sup>). This result is in agreement with a recent work performed in two genotypes of *Brassica napus* cultivated in filed conditions with 360 kg urea ha<sup>-1</sup> and showing that a Si spray supply lead to an improvement of seed yield (**Kuai et al., 2017**). Nevertheless, Si supply has not effect on seed yield quality components, such as thousand-seed weight, oil, glucosinolate, protein



**Figure III.2.6: Agronomic efficiency (A), apparent nitrogen recovery (B), nitrogen harvest index (C) and N content in fallen leaves (D) of plants harvested à T2 (G5 stage).** Plants were cultivated in lysimeter with 60 (60N) or 160 kg of N ha<sup>-1</sup> (160N) and supplied with or without Si (12 Kg of SiO<sub>4</sub> ha<sup>-1</sup>; 60N+Si, 160N+Si). Values correspond to mean ± SE for n=3. The data obtained from plants treated with silicon (60N+Si and 160N+Si) were compared to their respective control (60N and 160N) using the Student t test and \* represent the statistic differences (p < 0.05). Different letters indicate significant difference between treatments (p < 0.05).

concentrations, and  $\omega_6$ :  $\omega_3$  ratio which are not significantly different in seeds from 160N and 160 N+Si (**Table III.2.2**). Moreover, no significant difference of N residual in leaf of these plants suggesting that Si has not impact on N remobilization from leaf towards seeds. This result is in agreement with nitrogen harvest index, a component which indicates efficiency of N plant remobilization to the seeds, which is similar between 160N and 160N+Si plants (**Figure III.2.6C**). Taken together, these results show that the better N uptake by 160N+Si plant leads to an increase of seed yield but does not conduct to a production of seeds with higher N concentrations (**Figure III.2.5A**). This is confirmed by the agronomic efficiency (**Figure III.2.6A**), a component which measures efficiency of converting N supplied to seed yield, which is 1.5 fold higher for 160N+Si than 160N plants. This means that 1 kg of N supplied with Si allows a production of 14.2 kg of seeds against only 9.3 kg of seeds when N is supplied alone. All these data indicates that Si supply allow to reduce the N input only when N is not limiting for plant growth. For example, in our study it could be suggest that Si supply could allow a decreasing N input from 160 kg N ha<sup>-1</sup> to around 106 kg N ha<sup>-1</sup> without impact on seed yield. In addition, this study shows that a Si supply has positive effect on micronutrient concentrations in seeds. Thus, Si supply leads to an increase of nickel (Ni) concentration is observed only in seeds from plants cultivated with the lower N fertilization (60N; **Figure III.2.5D**) and for the both N fertilization levels (60 or 160N) to an increase of seeds iron (Fe) and cobalt (Co) concentrations (**Figures III.2.5B and III.2.5C**). Even if an improvement of remobilization/allocation of these nutrients by Si cannot be excluded, this increase of nutrient concentrations in seed could be also due to a stimulation of root uptake as demonstrated for Fe and nitrate in *Brassica napus* and *Valerianella locusta* L. (**Gottardi et al., 2012; Haddad et al., 2018**). These results are so interesting because these micronutrients in addition to be knew to be important for plant metabolism (**Tottey et al., 2003**), they are also considered as beneficial for mammalian nutrition and health (**Abbaspour et al., 2014**). Thus, for example, Fe and Co are involved in synthesis of hemic enzymes (as hemoglobin and myoglobin; **Yip et al., 1996; McDowell et al., 2003**) and for synthesis of B12 vitamin, respectively. Moreover according to the **World Health Organization (2002)**, Fe is one of nutrients deficient in the diet of more than half of the world's and an increase of it in edible part of plant (so called biofortification) could allow to face it as previously suggested by **Billard et al. (2014)**.





**Supplementary Figure III.2.S1: Total dry weight (A) and nitrogen amount (B) of vegetative part and seeds of rapeseed plants cultivated without nitrogen supply and harvested at T2 (G5 stage). Values correspond to mean  $\pm$  SE for n=3.**

### III.1.E. Conclusion

As a conclusion, this study shows that, in field conditions, a Si supply lead to a better N efficiency by *Brassica napus* cultivated with N input considered as not limiting for growth and development. This better N efficiency is due to a better N uptake but not a better N remobilization allowing an improvement of seed yield without affect seed quality. In addition, this study shows the great interest to combine N and Si fertilizers in order to lead a biofortification of *Brassica napus* seeds.

### Acknowledgements

We are most grateful to the PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) core facility for all the element and isotope analysis used in this study. We thanks N. Nési from IGEPP team (Rennes, France) for NIRS analysis. We thank also European Union for its support of research projects in Normandy. Finally, the authors are most grateful to Laurence Cantrill for improving the English in the manuscript.



**Supplementary Table III.2.S1: Macro (grey) and micronutrient (white) concentrations in mature seeds from rapeseed plants harvested at T2 (G5 stage).** Plants were cultivated in lysimeter with 60 (60N) or 160 kg of N ha<sup>-1</sup> (160N) and supplied with or without Si (12 Kg of SiO<sub>4</sub> ha<sup>-1</sup>; 60N+Si, 160N+Si). Values represent mean ± SE for n=3.

Element	60N	60N+Si	160N	160N+Si
Ca (mg g <sup>-1</sup> )	3.89±0.08	3.87±0.18	3.61±0.19	3.52±0.21
K (mg g <sup>-1</sup> )	5.61±0.39	5.34±0.20	5.72±0.04	5.61±0.15
Mg (mg g <sup>-1</sup> )	1.83±0.07	1.74±0.07	1.82±0.06	1.72±0.04
P (mg g <sup>-1</sup> )	4.12±0.13	3.93±0.20	3.62±0.17	3.54±0.09
S (mg g <sup>-1</sup> )	3.04±0.05	2.86±0.08	3.45±0.12	3.17±0.11
B (µg g <sup>-1</sup> )	11.22±0.25	10.84±0.14	11.73±0.33	11.30±0.55
Cd (ng g <sup>-1</sup> )	23.08±5.31	24.10±1.32	28.87±1.73	29.99±2.11
Cu (µg g <sup>-1</sup> )	2.61±0.07	2.58±0.06	2.90±0.35	2.79±0.17
Mn (µg g <sup>-1</sup> )	25.46±0.61	25.40±1.16	27.26±0.58	26.10±0.61
Mo (µg g <sup>-1</sup> )	0.38±0.06	0.40±0.02	0.35±0.01	0.35±0.02
Se (ng g <sup>-1</sup> )	37.20±0.66	30.21±4.27	25.80±3.37	29.90±1.85
Zn (µg g <sup>-1</sup> )	28.77±0.64	27.89±0.66	36.43±5.33	33.41±4.13



---

### Chapitre IV.3. Silicon supply broadly affects the root transcriptome of *Brassica napus* L.

---

**Contexte:** Bien que le silicium (Si) ne soit pas considéré comme un élément essentiel pour la croissance des plantes, plusieurs études démontrent son effet bénéfique sur les plantes particulièrement quand elles sont cultivées en condition de stress. L'origine de ces effets est encore mal connue. En effet, si certains auteurs attribuent au Si un rôle exclusivement mécanique (renforcement des parois cellulaires), d'autres suggèrent que cet élément pourrait être à l'origine, au niveau cellulaire, de modifications de l'expression de gènes impliqués notamment dans les voies métaboliques conduisant à une meilleure tolérance aux stress biotiques et abiotiques. Les résultats obtenus en conditions contrôlées et notamment ceux montrant un effet du Si sur l'expression de gènes codant les transporteurs d'N, permettent de suggérer que chez le colza, le Si pourrait effectivement avoir un rôle signalétique en plus de son action mécanique.

**Objectif:** Chez le colza, le Si absorbé est majoritairement accumulé au niveau racinaire, une approche de « RNA sequencing (RNAseq) » a été conduite afin d'étudier l'effet d'un apport de Si de courte durée (7 jours, 1,7 mM) sur le transcriptome racinaire.

**Démarche expérimentale:** Des plantes de colza sont prétraitées avec du Si (+Si; 1,7 mM) ou non (-Si) pendant 7 jours. Les plantes sont récoltées en séparant parties aériennes et parties racinaires et leur biomasse fraîche est déterminée. Les ARN totaux racinaires sont extraits par la méthode au phénol chaud avant d'être envoyés à la plateforme IPS2 de Saclay en vue de l'analyse comparative des transcriptomes racinaires des plantes +Si et -Si par RNAseq.

**Résultats:** L'acquisition des résultats de l'analyse RNAseq étant très récente (courant Juillet 2018), seule une analyse préalable des données sera présentée dans le cadre de cet article actuellement en cours de rédaction. La rédaction définitive de celui-ci, nécessitera une analyse plus poussée qui sera effectuée dans le courant de l'année 2019.

Les résultats montrent que le traitement Si se traduit par une modulation de l'expression de 1040 gènes, parmi lesquels 323 sont induits et 717 sont réprimés. L'utilisation de logiciels d'analyses transcriptomiques (MapMan) a permis de classer les gènes différemment exprimés dans les différentes voies métaboliques. Ainsi, ces analyses montrent notamment que de nombreux gènes impliqués dans le renforcement des parois cellulaires ou dans la résistance aux stress biotiques et abiotiques sont surexprimés dans les racines de plantes traitées au Si.

Bien que préliminaires, ces résultats montrent le rôle signalétique du Si au niveau racinaire chez le colza.



### III.3. Silicon supply broadly affects the root transcriptome of *Brassica napus* L.

Cylia Haddad<sup>1#</sup>, Jacques Trouverie<sup>1#</sup>, Mustapha Arkoun<sup>2</sup>, Jean-Claude Yvin<sup>2</sup>, José Caïus<sup>3,4</sup>, Véronique Brunaud<sup>3,4</sup>, Philippe Laine<sup>1#</sup>, Philippe Etienne<sup>1#\*</sup>

<sup>1</sup>Normandie Université, UNICAEN, INRA, UMR 950 EVA, SFR Normandie Végétal (FED4277), 14000 Caen, France

<sup>2</sup>Centre Mondial d'Innovation, Groupe Roullier, 35400 Saint Malo, France

<sup>3</sup>Institute of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2), CNRS, INRA, Université Paris-Sud, Université d'Evry, Université Paris-Saclay, Bâtiment 630, Plateau de Moulon, 91192 Gif sur Yvette, France

<sup>4</sup>Institute of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2), CNRS, INRA Université Paris-Diderot, Sorbonne Paris-Cité, Bâtiment 630, Plateau de Moulon, 91192 Gif sur Yvette, France

\*Corresponding author email: philippe.etienne@unicaen.fr; phone: +33 231 565 374; fax: +33 231 565 360.

#These authors have equally contributed to this work.

Footnotes: Doctoral fellowship co-funded by European Union, Normandy County Council, in the framework of the ERDF-ESF operational program 2014-2020 and the CMI group Roullier.

#### Abstract

**Main conclusion: Modulation of gene expression in root of *Brassica napus* by silicon (Si) supply could allow plants to cope with future stress.**

The origin of the beneficial effects of silicon (Si) on plants, especially when they are subject to stress, remains poorly understood. Some authors shown that Si alleviates plant stress and consider that this is mainly due to a mechanical effect on the cell wall. In addition, others studies shown that Si could also affect expression of genes and modulate some metabolic pathways, especially in plants cultivated in stress conditions. In a previous study, **Haddad et al. (2018)** shown that a pretreatment of *Brassica napus* plant by Si (1.7mM) during one week allows to alleviate stress induce by N privation. From these results, it can be suggest that this better resistance of Si-treated plants could be due to the establishment of defense mechanisms prior to the exposure to the N stress. The aim of this work was to test this assumption in *Brassica napus* roots (where Si is mainly stored) using a transcriptomic approach by RNA sequencing (RNAseq). Our results showed that the Si supply leads to a modulation of the expression of genes in root of *Brassica napus*. Functional categorization of the differentially expressed genes (DEGs) shows that numerous genes are involved in different metabolic pathways and especially, in cell wall synthesis, phytohormones metabolism and in stress response. All these results show that Si modifies the root metabolism of *Brassica napus*, which could allow a better adaptation to future stresses.





**Key words:** *Brassica napus*, roots, RNAseq, Silicon

### III.3.A. Introduction

Silicon (Si) is a major constituent of the earth's crust, covering 28% of the lithosphere (Epstein, 1994). For several years, the role of silicon in plant has been extensively studied through numerous studies (Cuskon et al., 2019). Yet to date, Si is considered as a beneficial but not essential element for plant growth and development (Guntzer et al., 2012). The beneficial effects of Si supply has been found especially in plants subjected to either biotic or abiotic stresses (Keeping and Reynolds, 2009; Liang et al., 2015). For example, Si is effective to reduce diseases caused by both fungi and bacteria in different plant species (Ma and Yamaji, 2006), to increase plant resistance to drought (Eneji et al., 2008), to alleviate salt-stressed (Azeem et al., 2015). In a recent study, Haddad et al. (2018) shown that a pretreatment of *Brassica napus* plant by Si (1.7mM, one week) enhances growth and alleviates stress induced by N privation. This study suggests that Si supply plants could promote defense mechanisms prior to the exposure to the N stress. Main known mechanisms attributed to Si-benefits are the mechanical barrier formed by the accumulation and polymerization of Si as Si(OH)<sub>4</sub> in cell walls (Guerriero et al., 2016), which promotes strengthening of the extracellular matrix and provides increased mechanical support to the plant. However, the role of Si remains still inconclusive (Epstein 1994; Guntzer et al., 2012; Pontigo et al., 2015) since Si does not seem to act as a direct signal or second messenger (Vivancos et al., 2015; Coskun et al., 2019). Indeed, only few genes are modulated by a Si supply especially when plants are cultivated under unstressing conditions (Fawe et al., 2001; Watanabe et al., 2004; Fauteux et al., 2006; Chain et al., 2009; Rasoolizadeh et al., 2018).

To decipher the role of Si in priming defense mechanism we performed a wide-ranging analysis of the influence of Si on the root transcriptome of *Brassica napus* because of the major role of this compartment not only in Si uptake but also in its storage (Lux et al., 2003; Haddad et al., 2018). Thus, a comparative analysis of the root genes expression between plants supplied with (1.7 mM) or without Si has been performed using RNA sequencing (RNAseq) technology to detect differentially expressed genes (DEGs) and identify the functional categories and metabolic pathways in which they could be involved.

### III.3.B. Materials and methods

#### a. Seedling growth and Si treatment



*Brassica napus* L. (var. "Citizen") seeds were germinated on perlite over deionized water for 4 days in dark. Seedlings were then transferred to natural light conditions and supplied with the nutrient solution previously described by Haddad et al. (2018). After emergence of the first leaf (after 2 weeks), seedlings were transferred to hydroponic tanks (20 L) containing the same nutrient solution as before. The natural light was supplemented by high-pressure sodium lamps (MASTER Greenpower T400W, Philips) providing photosynthetically active radiation (PAR) of 450  $\mu\text{mol}$  of photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  at the canopy level for 16h per day. The thermoperiod was 20°C (day) and 15°C (night). After the emergence of the fourth leaf, plants were split in two batches: one (+Si) supplemented with 1.7 mM sodium silicate ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3, 9\text{H}_2\text{O}$ ) and the other one (-Si) supplemented with 1.7 mM of sodium chloride. The pH of the nutrient solutions were buffered to 5.6. After one week, roots of plants were rinsed three folds with nutrient solution without Si (pH 5.6) then shoot and root samples were separated and frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  for further analysis. For all analysis, three biological replicates ( $n=3$ ) corresponding to a pool of three plants were used.

#### **b. Silicon analysis**

Silicon content in plants were determinate from 100 mg of dried and crushed plants tissues (shoots and roots), using a colorimetric method previously described by **Haddad et al. (2018)**.

#### **c. RNA extraction and RNA sequencing (RNAseq) technology**

Total RNAs were extracted from 200 mg of root samples using hot phenol method as previously described by **Haddad et al. (2018)**. Purification of RNAs including a step of DNA digestion by DNase treatment was performed using RNeasy mini kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Sequencing technology used was on Illumina NexSeq500 (IPS2 POPS platform). RNAseq libraries were performed by TruSeq Stranded mRNA protocol (Illumina®, California, and U.S.A) in paired-ends (PE), sizing of 260bp and a read length of 75 bases. Twelve samples by lane of NextSeq500 using individual bar-coded adapters and giving approximately 25 million of PE reads by sample were generated. A classical trimming (Qscore>20, read length>30) was performed to remove sequences of bad quality and the mapper STAR\_2.5.2a was used to align reads against the *Brassica napus* transcriptome (with local option and other default parameters). The abundance of each 52962 genes (annotation V5 from Genoscope: <http://www.genoscope.cns.fr/brassicanapus/data/>) was calculated by counts PE reads mapping



unambiguously one gene. According to these rules, 25% reads unmapped and 10% of PE reads with multi-hits were removed and 65% of PE reads were associated to a gene without ambiguity.

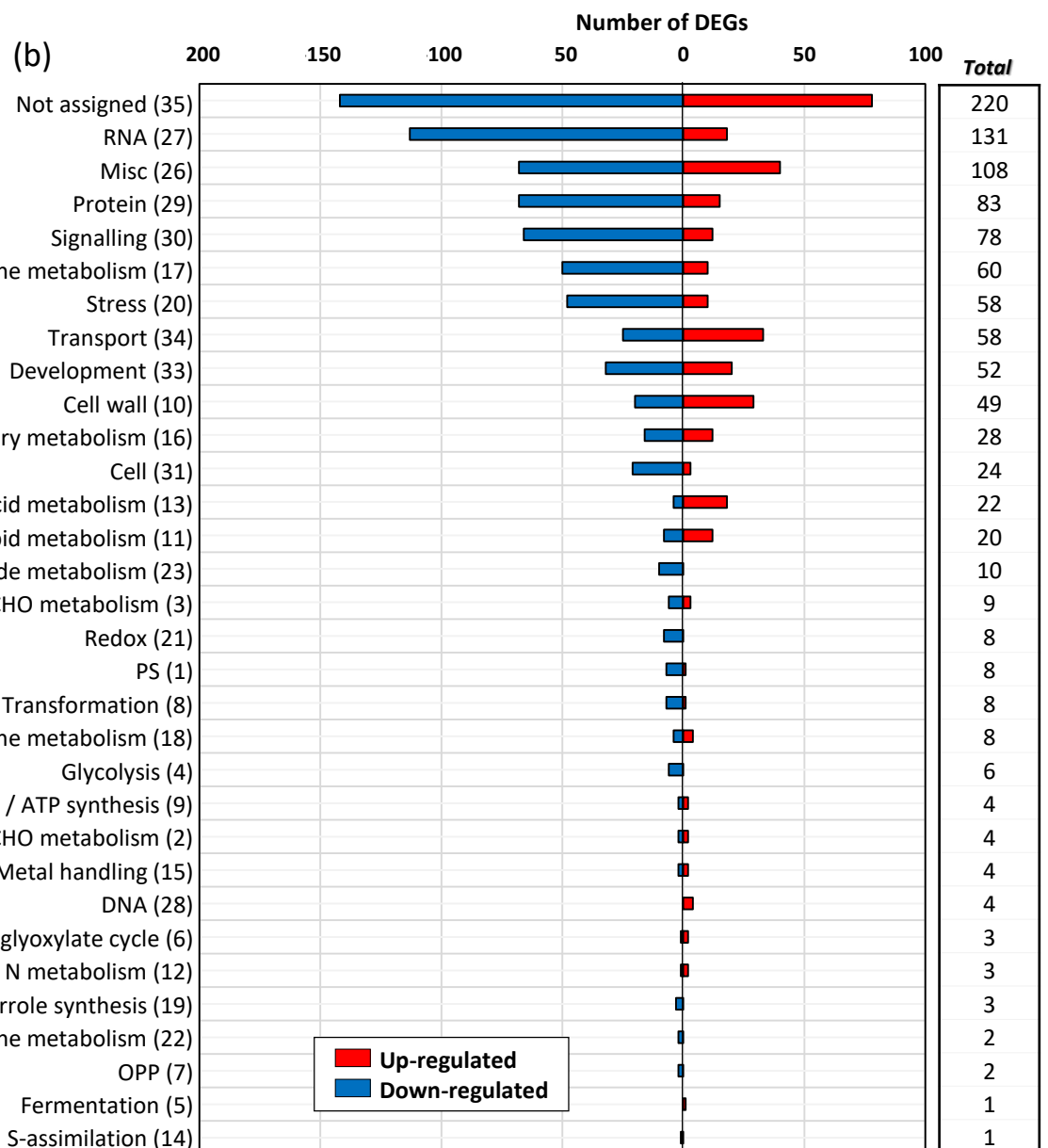
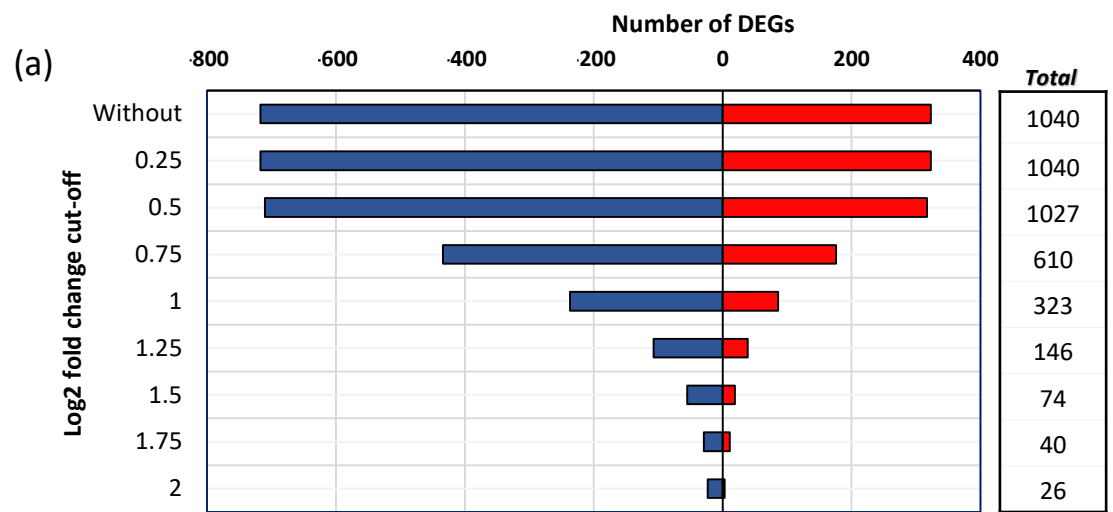
#### d. RNAseq bioinformatic analysis

Differential analysis followed the procedure described in **Rigaill et al. (2016)**. Library size was normalized using the trimmed mean of M-value (TMM) method and count distribution was modeled with a negative binomial generalized linear model. Dispersion was estimated by the edgeR method (V1.12.0, McCarthy, 2012). Expression differences were compared between +Si and -Si plants using likelihood ratio test and *p-values* were adjusted by the Benjamini-Hochberg procedure to control False Discovery Rate (FDR, *p-value* < 0.05). Considering our experimental context (Si supply attended to have a priming effect on unstressed plants), we have chosen to consider a gene as differentially expressed for an adjusted *p-value* ≤ 0.05 whatever the absolute value of “Log2 fold change”. Fragments Per Kilobase Million (FPKM) were calculated for visual analysis only, and were obtained by dividing normalized counts by gene length. For all Differentially Expressed Genes (DEGs), the gene ontology and the MapMan bank identification number (BIN) ontology were assigned using *Brassica napus* GO annotations from Genoscope (2015-04-27) and Mercator Automated Sequence Annotation pipeline (V3), respectively. In addition, each *Brassica napus* CDS (from Genoscope V5) was Blast on NCBI *Viridiplantae* nucleotide database to find the best *Brassica napus* RNA match.

RNAseq expression data were validated by using four DEGs with contrasted fold changes for RT-qPCR analyze. RT and qPCR were performed following the protocol described by **Haddad et al. (2018)**. The primers used and the results of RT-qPCRs are presented in **Supplementary Table III.3.S1**.

Gene ontology enrichment analysis for Differentially Expressed Genes (DEGs) was performed with gene ontology (GO) information slimed to plants using BiNGO plug-in (V3.0.3) of the Cytoscape platform (V3.7.0). Hypergeometric test was applied to identify enriched GO terms (*p-value* ≤ 0.05 was considered as significant). In addition, pathway analysis of DEGs was carried out using MapMan (V3.6.0) with the *Brassica napus* CDS annotation (Genoscope V5), the biotic stress pathway overview layout and a *p-value* cut-off of 0.05.

#### e. RNA-Seq data management



**Figure III.3.1:** (a) Number of Differentially Expressed Genes (DEGs) in root of *Brassica napus* supplied with 1.7 mM of Si during one week. Number of DEGs was determined in function of the "Log2 fold change" cut-off on the RNAseq dataset genes for which p-value adjusted is  $\leq$  to 0.05. (b) Functional classification of all DEGs (without "Log2 fold change" cut-off). DEGs were categorized into major MapMan BIN groups (BIN numbers in brackets). DEGs with multiple BIN assignments were affected in each corresponding functional class. For each functional class, the up-regulated (red), down-regulated (blue) and the total number (in frame) of DEGs were indicated.

All steps of the experiment, from growth conditions to bioinformatic analyses, were managed in CATdb database (**Gagnot et al., 2007**; ProjectID: NGS2017\_08\_Brasilice). RNAseq project was submitted in the international repository GEO (Gene Expression Omnibus; **Edgard et al. 2002**; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>; GEO accession: GSE122968).

#### f. Statistical Analysis

Statistical analyses of silicon contents were performed with the software Microsoft® Excel 2010/XLStat® 2016. Analysis of variance were conducted using Student test after verifying compliance of normality of the data and homogeneity of variance using the Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively.

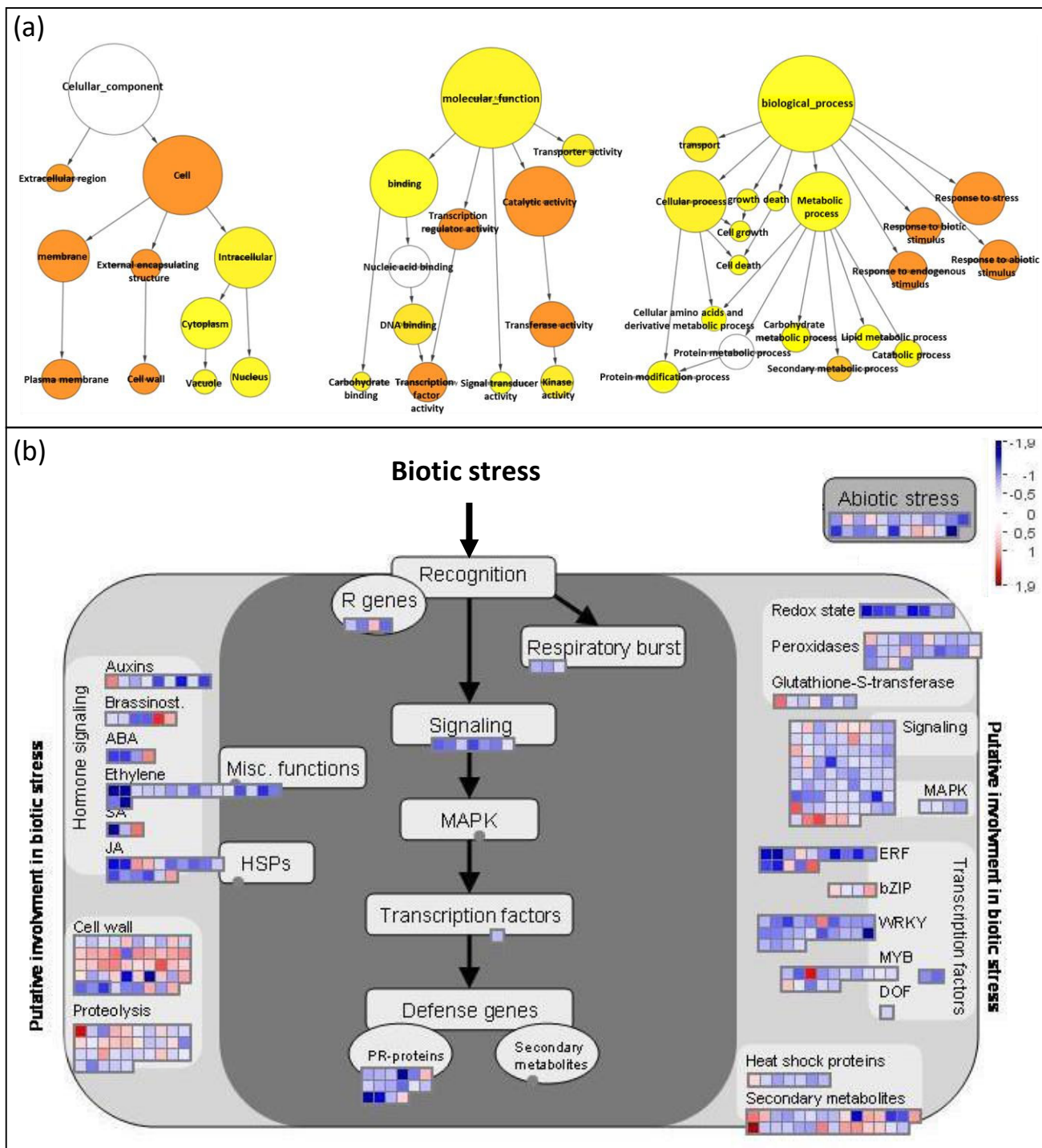
### III.3.C. Results and discussion

The present study aims to provide a comprehensive root transcriptome survey to identify metabolic pathways responsive to external silicon supply to *Brassica napus* cultivated under no-stressing conditions. For this, plants was cultivated in hydroponic conditions for 7 days and supplemented (+Si; 1.7 mM) or not (-Si) with silicon.

Despite *Brassica napus* belong to a non-Si accumulator species (**Guntzer et al. 2012**), Si was efficiently taken up by *Brassica napus* ( $3.89 \pm 0.19$  versus  $6.34 \pm 0.05$  mg g<sup>-1</sup> DW in -Si and +Si plants, respectively) and mainly stored in the roots ( $0.173 \pm 0.02$  versus  $0.384 \pm 0.02$  mg g<sup>-1</sup> DW in -Si and +Si plants, respectively). These results are in agreement with those reported by **Farshidi et al. (2012)** and more recently by **Haddad et al. (2018)**. This storage of Si mainly in roots is an argument to focus on the effect of Si on genes regulation and subsequent metabolic pathways modulations in this compartment.

This study shows that the number of DEGs in response to Si is quite low in roots (74 DEGs; **Figure III.3.1.A**) when the log2Fold change threshold is arbitrary set up to 1.5, a classical value for DEGs analysis with RNAseq. This result is in agreement with numerous studies showing that Si supply on unstressed plants lead to only 50 DEGs in roots of soybean (**Rasoolizadeh et al., 2018**) or 2, 20 and 47 DEGs in leaves of *Arabidopsis*, rice and wheat, respectively (**Watanabe et al. 2004**, **Chain et al. 2009**, **Fauteux et al., 2006**). Nevertheless, considering the assumption that Si could play an indirect role leading to a priming effect on unstressed *Brassica napus* plants (**Haddad et al., 2018**), it seems to be relevant to consider also genes with lower log2Fold changes. Thus, by applying this criteria (all log2fold changes for a FDR





**Figure III.3.2:** (a) Gene Ontology (GO) enrichment for differentially expressed genes (DEGs) in root of *Brassica napus* after 7 days of treatment with silicon. Size of node is related to the number of transcripts in that category and color shading is according to p-value (white: no significant differences; yellow: p-value = 0.05; orange: p-value < 5.00  $\cdot 10^{-7}$ ). (b) Metabolic pathway overview (from MapMan) of DEGs involved in stress response. Each square represent one DEG and its shading represents its up (red) or down-regulation (blue). The color scale refers to the fold change of differentially expressed transcripts.

adjust p-value  $\leq 0.05$ ), the number of DEGs in the roots reach 1040 (**Figure III.3.1.a**). Among them 323 (31%) genes were significantly up-regulated and 717 (69%) were down-regulated (**Figure III.3.1.a**). Upon functional categorization (BIN Groups) of these DEGs, except the “not assigned” (21% of DEGs) and “Misc” (10.4% of DEGs) categories, the most representative categories were “RNA”, “Protein”, “Signaling”, “Hormone metabolism”, “stress”, “Transport”, “Development” and “Cell wall” (54% of DEGs for the 8 categories on 30; **Figure III.3.1.b**). This indicates that rapeseed initiates broad molecular modifications in response to Si supply but it is interesting to note that DEGs were not randomly distributed but belong to a limited number of functional categories. RNA, signaling, hormone metabolism, stress and cell wall are the functional categories often reported in various studies on silica (**Manivannan et al., 2017**). This strengthens hypothesis on the putative physiological roles of Si to alleviate stresses in plants (**Pontigo et al., 2015; Etesami and Jeong, 2018, Coskun et al., 2019**).

In agreement with this role of Si in preventing stresses, GO enrichment and MapMan classification revealed a modulation of numerous DEGs directly or indirectly associated with biotic and abiotic stress responses (**Figures III.3.2 a and b**). Their functional annotation (**Table III.3.1**) shows that 30 of them are related to biotic stress (BIN 20.1) and 21 to abiotic stress (BIN 20.2). Most of them are down-regulated (41) by Si under our conditions. DEGs involved in stress phytohormone metabolisms such as ABA, ethylene, JA and SA (BIN 17.1; 17.5; 17.7 and 17.8) were also mainly down-regulated (**Figure III.3.2.b; Table III.3.1**). These results are in agreement with previous studies showing that Si while prevents biotic (or abiotic) damages it down-regulates in the same time numerous stress resistance genes (**Rasoolizadeh et al., 2018**), and/or it adjusts the level of phytohormones to maintain plant homeostasis (**Kim et al. 2014 ; Fauteux et al. 2006 ; Ghareeb et al., 2011**). Therefore, in these conditions, the effect of Si could be prophylactic making plant more efficient to respond to future stresses. As reviewed in an original way by **Wang et al. (2017)**, Si-mediated primes plant defense responses involving the establishment of physical and biochemical mechanisms. The reinforcement of the cell wall is one of the most documented throughout numerous studies showing a benefit role of Si deposition in the cell wall rigidity associated to a better pathogen resistance (**Coskun et al., 2019**). In unstressed environments, Si increases also cell wall elasticity during extension growth by interacting with pectins and polyphenols, or by enhancing roots suberization or lignification, resulting in anatomical plasticity and adaptive regulation of root function (**Hattori et al. 2003; Hossain et al., 2007; Fleck et al., 2011; Zhang et al., 2013; Barberon et al., 2016**).

**Table III.3.1.** Number of Differentially Expressed Genes (DEGs) from transcriptome of *Brassica napus* roots related to cell wall, hormone metabolism, biotic and abiotic stresses MapMan categories, grouped by the first two layers (or the first three layers for BIN 20).

BIN code	Total DEGs	Up-regulated	Down-regulated	BIN name
10.1	5	1	4	cell wall.precursor synthesis
10.2	4	1	3	cell wall.cellulose synthesis
10.3	1	0	1	cell wall.hemicellulose synthesis
10.6	19	18	1	cell wall.degradation
10.7	17	7	10	cell wall.modification
10.8	3	2	1	cell wall.pectin esterases
17.1	4	1	3	hormone metabolism.abscisic acid
17.2	8	0	8	hormone metabolism.auxin
17.3	6	2	4	hormone metabolism.brassinosteroid
17.4	1	0	1	hormone metabolism.cytokinin
17.5	17	0	17	hormone metabolism.ethylene
17.6	4	2	2	hormone metabolism.gibberelin
17.7	13	2	11	hormone metabolism.jasmonate
17.8	3	1	2	hormone metabolism.salicylic acid
20.1	12	5	7	stress.biotic
20.1.1	3	0	3	stress.biotic.respiratory burst
20.1.2	3	1	2	stress.biotic.receptors
20.1.3	1	0	1	stress.biotic.signaling.MLO-like
20.1.5	1	0	1	stress.biotic.regulation of transcription
20.1.7	10	1	9	stress.biotic.PR-proteins
20.2	3	1	2	stress.abiotic
20.2.1	7	1	6	stress.abiotic.heat
20.2.2	1	0	1	stress.abiotic.cold
20.2.3	6	0	6	stress.abiotic.drought/salt
20.2.4	1	0	1	stress.abiotic.touch/wounding
20.2.99	3	1	2	stress.abiotic.unspecified

This assumption supported by the apoplastic obstruction model proposed by Coskun et al. (2019), could explain that the Si supply improves yield of rice (**Detmann et al., 2012**) or total biomass of *Brassica napus* (**Haddad et al., 2018**). Accordingly, in our study, 49 DEGs (29 up- and 20 down-regulated) related to cell wall synthesis (BIN 10.1-3), degradation (BIN 10.6) and modification (BIN 10.7) were modulated by Si in roots (**Figures III.3.2.a and III.3.2.b; Table III.3.1**).

### III.3.D. Conclusion

The high-throughput transcriptome analysis, for the first time performed in roots of *Brassica napus* allowed to obtain an overall survey of genes related to the responses to Si of *Brassica napus* cultivated under unstressing conditions. Taking into account the modulated gene-network in root, this study provides evidence that even under unstressed conditions, Si modulates a large pattern of genes involved in stress response.

### Acknowledgment

This research was partially supported by FEDER (Fonds Européen De Développement Economique Régional). The authors thank Laurence Cantrill for improving the English in the manuscript. The authors thanked the POPS Transcriptomic Platform benefits from the support of the LabEx Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-10-LABX-0040-SPS) for the achievement of RNAseq.

**Supplementary Table III.3.S1: Expression of selected DEGs in root *Brassica napus* supply with 1.7 mM of Si during 7 days.** Log2Fold Change and  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  represent the modulation of the expression of selected genes (in red in the table S1) from RNAseq and RT-qPCR analysis, respectively. For both analysis, the control was - Si plants.

Gene ID	log2Fold Change (p-value)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Nucleotide sequences of primers	gene accession number
EF1- $\alpha$	#N/A	#N/A	Forward 5'- TTTCGAGGGTGACAACATGA-3'	XM_013854440.2
			Reverse 5'- CCGTTCCAATACCACCAATC-3'	
18 S	#N/A	#N/A	Forward 5'- CGGATAACCGTAGTAATTCTAG-3'	KX709373.1
			Reverse 5'- GTACTCATTCCAATTACCAGAC-3'	
BnaA07g32570D	-8.09 (7.38E-99)	0.03±0.01 *	Forward 5'- ATAACGACCGCAGATTTTGG-3'	XM_013862524.2
			Reverse 5'- AGCTACGCCCGTAACAGCTA-3'	
BnaA05g03440D	-4.60 (2.46E-11)	0.34±0.23 *	Forward 5'- GGATGTGCGAGTTTCATGTG-3'	XM_013835916.2
			Reverse 5'- TGATGAAAGCCTGACGAGTG-3'	
BnaA09g13190D	2.25 (1.529E-06)	1.49±0.25 *	Forward 5'- TGCAGTTTTGTCTGGACGAG-3'	XM_013788930.2
			Reverse 5'- CGCGGTAATTTTCAGGGTTA-3'	
BnaC03g21710D	1.73 (6.43E-03)	1.61±0.16 *	Forward 5'- GTCCTGGGAAGAACTCATGG-3'	XM_013843966.2
			Reverse 5'- GGTAGGGACTCTGACGACGA-3'	

# Chapitre IV: Discussion générale



# Chapitre IV: Discussion générale





## Chapitre IV: Discussion générale

Les expérimentations conduites dans le cadre de cette thèse visaient à étudier l'effet d'un apport de silicium (Si) chez le colza (*Brassica napus* L.), une espèce notamment caractérisée par sa faible valorisation de l'azote absorbé. Le choix du Si a été motivé par les nombreuses études montrant des effets bénéfiques de cet élément chez diverses espèces végétales soumises à des stress biotiques et abiotiques variés (Ma et Yamaji, 2015; Rizwan et al., 2016; Frew et al., 2018). Cependant, parmi ces études, peu d'entre elles se sont intéressées à la caractérisation des effets physiologiques, biochimiques et moléculaires consécutifs à un court apport de Si. Par ailleurs, très peu d'études ont été menées chez le colza d'hiver, certainement du fait qu'il soit considéré comme un faible accumulateur de Si contrairement à d'autres espèces végétales telles que celles appartenant à la famille des Poacées comme par exemple le riz, le blé, l'orge ou encore le maïs. Dans le cadre de ces travaux, nous sommes partis du postulat que le caractère faiblement accumulateur de Si du colza n'était pas forcément un inconvénient puisque certains éléments bénéfiques peuvent agir à très faible dose. **Dans ce contexte, l'objectif général de ces travaux de thèse a consisté à étudier l'effet d'un apport de Si sur la gestion de l'N du colza et plus particulièrement sur les processus de sénescence associés à la remobilisation mais également sur les capacités d'absorption de l'N par cette plante.** Ainsi, deux expérimentations, l'une en conditions contrôlées au stade végétatif et l'autre en condition de plein champ sur l'ensemble du cycle de culture ont été réalisées sur des plantes soumises ou non à une alimentation azotée restreinte.

### **I. Contrairement à d'autres espèces, chez le colza, le Si est stocké dans les racines**

L'initiation de cette nouvelle thématique de recherche a soulevé une question majeure à laquelle il était nécessaire de répondre avant de développer les recherches envisagées: **le colza considéré comme faiblement, voire non accumulateur de Si, absorbe-t-il cet élément lorsqu'il est disponible dans le milieu sous sa forme assimilable (acide silicique:  $\text{Si}(\text{OH})_4$ )?**

Il était d'autant plus important de répondre à cette interrogation, que la majorité des travaux publiés à ce jour ne présentent que très rarement le contenu en Si *in planta*. Dans ce contexte, il a été nécessaire de mettre au point à partir des différentes méthodes disponibles dans la littérature, une méthode colorimétrique de dosage de Si. Ce préalable a été relativement long, environ 3 à 4 mois, mais à aboutit à la validation d'un protocole basé sur la

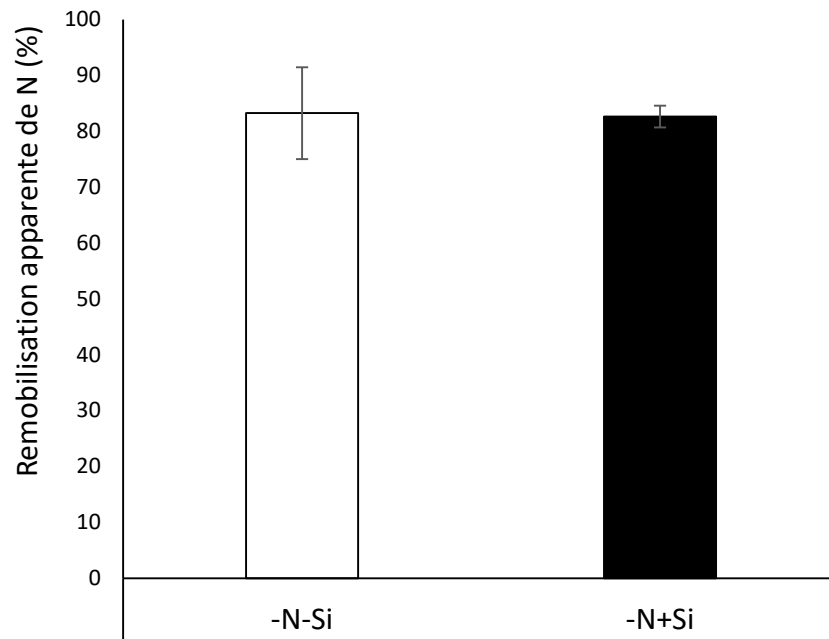


formation du complexe silicomolybdique (Hallmark et al., 1982; Dai et al., 2005) dont le détail est présenté dans la partie « Matériel et méthode de ce manuscrit (II.2.3) » et qui s'est révélée particulièrement fiable pour doser le Si dans les tissus végétaux.

Grâce à cette méthode, il a donc été possible de doser le Si dans les tissus racinaires et aériens de colza cultivés en hydroponie avec une solution nutritive contenant ou pas du Si (1,7 mM de Si). Les résultats obtenus nous ont montré que les plantes de colza cultivées pendant 7 jours en présence de Si contenaient significativement plus de Si que les plantes non traitées, révélant ainsi que le colza est capable de prélever cet élément lorsque celui est disponible dans la solution. Par ailleurs, la détermination des teneurs en Si dans les parties aériennes et racinaires montrent que cet élément est plus fortement accumulé au niveau racinaire (teneurs proches de 0,7% dans les racines des plantes alimentées avec du Si contre 0,3% dans les racines des plantes témoins) et peu au niveau foliaire (0,26 contre 0,20% respectivement dans les parties aériennes des plantes alimentées ou non en Si) (Chapitre III, Figure III.1.2). Cette accumulation racinaire de Si est surprenante puisque chez la majorité des végétaux, cet élément est généralement stocké au niveau des parties aériennes. Cette particularité pourrait être liée à une faible activité (ou une faible présence) des transporteurs racinaires de type Lsi2, impliqués dans le transfert du Si des racines vers les parties aériennes *via* la sève xylémique, et ou des transporteurs foliaires Lsi6 assurant le déchargement xylémique (Ma et Yamaji, 2015). Afin de vérifier ces hypothèses, l'existence de transporteurs (Lsi1, Lsi2 et Lsi6) a été recherchée au cours de nos études. Pour ce faire, les séquences des gènes codant des transporteurs de Si disponibles dans la littérature (maïs, riz, blé) ont été utilisées pour rechercher des gènes orthologues dans le génome de colza. Cependant, cette recherche n'a permis d'identifier aucun gène susceptible de coder des transporteurs de type Lsi1, Lsi2 et Lsi6. L'absence de transporteur de type Lsi1 est surprenante dans la mesure où celui-ci est nécessaire pour le prélèvement racinaire de Si par les plantes (Chapitre I, Figure I.16).

## II. Le Si améliore l'absorption d'N chez le colza

L'expérimentation conduite en hydroponie a montré que les jeunes plantes de colza alimentées pendant 7 jours avec 1mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  et 1,7 mM de Si (+N+Si) avaient une biomasse racinaire et foliaire significativement supérieures (facteur 1,5 quel que soit l'organe considéré) à celle seulement alimentées avec 1 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  sans Si (+N-Si) (Chapitre III, Figure III.1.2A). Par ailleurs, cette augmentation de croissance s'accompagne d'une augmentation



**Figure IV.1:** Remobilisation apparente de l'azote entre T0 et T12 de la feuille mature de colza prétraité ou non au silicium pendant une semaine et carencé en azote (-N-Si; -N+Si) pendant 12 jours. Les données sont des moyens  $\pm$  SE (pour n = 3).

des quantités d'N dans les parties racinaires et aériennes. Afin de mieux appréhender l'origine de cette augmentation du prélèvement d'azote, une étude de l'expression des gènes codant les transporteurs racinaires de nitrate et d'ammonium a été réalisée. Les résultats montrent que le traitement Si conduit seulement à une augmentation de l'expression du gène *BnaNRT2.1* codant un système de transport à forte affinité pour le nitrate (**Chapitre III, Figure III.1.3**). Ce résultat est en accord avec d'autres études, réalisées chez la laitue, montrant que le Si régule l'expression de gènes codant des transporteurs d'azote (**Gottardi et al., 2012**). De plus, l'expérimentation menée en conditions de plein champ sur un dispositif de cases lysimétriques confirme ce résultat. En effet, au cours de cette expérimentation, les plantes de colza traitées avec 12 Kg ha<sup>-1</sup> de Si et cultivée en présence de 160 kg ha<sup>-1</sup> d'azote présentent une meilleure (x1,3) capacité à prélever l'azote du sol (évaluée par le « Agronomic Nitrogen Recovery » (ANR); **Chapitre III, Figure III.2.6**) comparativement aux plantes n'ayant pas été traitées avec du Si. L'ensemble de ces résultats montre bien que le Si a un effet bénéfique chez le colza en stimulant ses capacités d'absorption de l'azote ce qui pourrait permettre de limiter les apports d'intrants azotés sans impacter négativement le rendement.

### **III. En situation de privation en N, le Si module la progression de la sénescence sans affecter la remobilisation d'N et permet une meilleure récupération des plantes**

Un prétraitement au Si d'une semaine permet de différer la sénescence foliaire des plantes soumises pendant 12 jours à une privation en azote. Ainsi, il a été constaté que le traitement Si permettait chez ces plantes un maintien des teneurs en chlorophylles dans les feuilles matures. L'utilisation de marqueurs moléculaires de progression de la sénescence (*SAG12/Cab*) a permis d'estimer que la durée de vie de ces feuilles matures était prolongée de 2,6 jours (**Chapitre III, Figure III.1.6**). Ce retard de sénescence pourrait être la conséquence d'une plus forte teneur foliaire en cytokine active (N<sub>6</sub>-Isopentenyladenine, **Chapitre III, Figure III.1.6**) et d'une possible induction d'enzymes de détoxification (**Liang et al., 2015; Shi et al., 2010; Tripathi et al., 2012; Liu et al., 2013**) conduisant à une diminution des teneurs foliaires en peroxyde d'hydrogène et en malondialdéhyde (**Chapitre III, Figure III.1.6**), deux marqueurs de stress oxydatif.

Toutefois, ce retard de sénescence ne s'accompagne pas d'une remobilisation d'azote plus efficace puisque la remobilisation d'azote foliaire apparente (calculée entre 0 et 12 jours) est identique chez les plantes -N+Si et -N-Si (**Figure IV.1**). Cette absence d'effet du Si sur



l'efficacité de remobilisation a également été constatée en condition de plein champ *via* le calcul de « Nitrogen Haverst Index » (NHI) dont les valeurs sont identiques que les plantes soient traitées au non avec du Si (**Chapitre III, Figure III.2.6**). Néanmoins, bien que l'augmentation de durée de vie foliaire ne s'accompagne pas d'un meilleur vidage en azote des feuilles, elle pourrait cependant avoir un effet positif sur la meilleure absorption d'azote observée en réponse au traitement Si. En effet, ce maintien de l'activité photosynthétique pourrait contribuer à une synthèse prolongée de composés carbonés dont certains (glucose, par exemple) sont essentiels à la synthèse d'énergie et d'autres, tels que le saccharose, sont capables de stimuler l'expression des gènes codant les transporteurs racinaires d'azote (**Lejay et al., 2003**). Cette hypothèse est en accord avec les résultats obtenus lorsque les plantes initialement privées en azote (-N+Si et -N-Si) sont réalimentées avec 1 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . En effet, une induction de l'expression des gènes codant des transporteurs d'azote *BnaNRT1.1* et *BnaNRT2.1* (**Chapitre III, Figure III.1.7**) a été observée seulement chez plantes préalablement traitées avec du Si. Cette induction étant très tardive par rapport au traitement Si (qui a eu lieu 3 semaines auparavant), un effet indirect du Si, *via* le maintien de la production de composés carbonés, semble le plus probable. Ceci suggère que le Si pourrait agir soit directement sur l'expression des gènes codant les transporteurs d'azote lorsque la plante est correctement alimentée en N (J0), soit indirectement lorsque les plantes sont en situation de privation en azote.

Cet effet stay-green observé au stade rosette en condition contrôlée a été observé également lors de l'expérimentation conduite en condition plein champ. En effet, au stade floraison uniquement, comparativement aux plantes cultivées avec  $160 \text{ kg N ha}^{-1}$ , une augmentation du pourcentage de feuilles vertes (associée à une diminution du pourcentage de feuilles sénescentes) a été observée chez les plantes ayant reçu  $12 \text{ Kg ha}^{-1}$  de Si et une fertilisation de  $160 \text{ kg N ha}^{-1}$ . Toutefois, aucun impact de l'apport de Si n'a pu être mis en évidence sur la sénescence des plantes cultivées avec  $60 \text{ kg N ha}^{-1}$  (**Chapitre III, Figure III.2.3**). Ce résultat est d'autant plus surprenant que de nombreuses études rapportent que l'effet bénéfique du Si est généralement observable lorsque les plantes sont soumises à un stress biotique ou abiotique (**Ma et Yamaji, 2015; Tripathi et al., 2015; Meunier et al., 2017; Ali et al., 2018**). Toutefois, il peut être suggéré que la faible dose d'azote apportée ( $60 \text{ kg N ha}^{-1}$ ) est





trop limitante (sur une longue durée de culture) et impacte tellement la croissance qu'il devient impossible d'observer un potentiel effet bénéfique du Si.

Outre les effets sur l'absorption de l'azote, le prétraitement Si permet également aux plantes de mieux récupérer après une période de carence en N. En effet, lorsque de l'azote est à nouveau disponible dans le milieu, les plantes +Si-N voient leur teneur en chlorophylles et leur activité photosynthétique (feuille mature) augmenter mais présentent également une induction de l'expression des gènes codant les transporteurs de nitrate (*BnaNRT1.1* et *BnANRT2.1*) qui s'accompagne d'un plus fort prélèvement d'azote (**Chapitre III, Figure III.1.7**). D'un point de vue agronomique, ce processus de récupération pourrait s'avérer particulièrement intéressant puisqu'il pourrait permettre aux plantes de mieux s'adapter à la disponibilité fluctuante des nutriments dans le sol au cours d'un cycle de culture. A titre d'exemple, il peut être suggéré qu'un prétraitement Si pourrait s'accompagner d'une meilleure résistance des plantes à une privation en nutriments (par exemple en azote) consécutive à une période de sécheresse et ainsi permettre à ces plantes de reprendre leur croissance plus rapidement lorsque les conditions hydriques deviennent à nouveau favorables.

#### IV. Le Si améliore le rendement en graines et leur contenu en micronutriments

Lors de l'expérimentation menée en condition de plein champ, il a été montré qu'un apport de 12 Kg Si ha<sup>-1</sup> permettait d'améliorer le rendement grainier des plantes cultivées avec 160 kg N ha<sup>-1</sup> (**Chapitre III, Tableau III.2.2**) d'environ 16%. Ce gain de rendement est en accord avec les résultats de **Kuai et al. (2017)** montrant qu'une pulvérisation racinaire d'acide silicique se traduit par une augmentation du rendement grainier du colza. Dans notre étude, le gain de rendement peut, en partie, s'expliquer par un meilleur prélèvement de l'azote du sol (montré grâce à l'indice ANR, **Chapitre III, figure III.2.6**) et *a priori*, pas par une meilleure remobilisation d'azote des feuilles vers les graines (montré grâce l'indice NHI, **Chapitre III, figure III.2.6**). En outre, si les teneurs en protéines et en huile des graines n'est pas impactée par l'apport de Si, ce dernier permet néanmoins une augmentation significative des teneurs en fer (Fe) et cobalt (Co) dans les graines quelle que soit le niveau de fertilisation azoté pratiqué. Par ailleurs, il a également été montré que cet apport de Si permettait d'augmenter la teneur en nickel (Ni) des graines de plantes cultivées avec 60 kg N ha<sup>-1</sup>. Bien qu'inattendu, cet effet biofortifiant du Si qui conduit à un enrichissement des graines en micronutriments



bénéfiques pour la santé humaine (Fe: lutte contre l'anémie, Co: utile à la synthèse de vitamine B12 et Ni: régulation de la tension artérielle et la glycémie) pourrait s'avérer particulièrement intéressant puisqu'il est largement avéré que ces micronutriments font défaut dans les régimes alimentaires actuels (Allen, 2006). Par ailleurs, l'augmentation de la teneur en Ni chez les plantes traitées au Si est également intéressante puisque cet élément est essentiel au bon fonctionnement des uréases des plantes, enzymes qui permettent l'hydrolyse de l'urée en ammonium. Ainsi, le Ni pourrait éviter l'accumulation toxique d'urée dans les feuilles et ainsi permettre une meilleure utilisation de cette molécule azotée par les végétaux, et notamment le colza considéré comme une plante particulièrement sensible au stress uréique (Arkoun et al., 2012).

#### V. Le Si module l'expression de nombreux gènes racinaires

Dans la littérature, il est généralement admis que le Si absorbé par les végétaux joue principalement un rôle mécanique en s'accumulant au niveau pariétale et améliore ainsi, le port des feuilles et une meilleure acclimatation au stress biotiques et abiotiques (Zanão Júnior et al., 2010). Toutefois, selon d'autres auteurs (Fawe et al., 2001; Côté-Beaulieu et al., 2009 ; Grégoire, 2013), 1% du Si absorbé reste à l'état soluble au niveau cellulaire et agirait comme molécule signal capable de moduler l'expression de certains gènes. Dans le cadre de nos études, la modulation de l'expression de plusieurs gènes (*BnaNRT1.1*, *BnaBNRT2.1*, *Cab*, *SAG12*) suggère en effet un rôle signalétique du Si. Nos résultats sont en accord avec les études menées jusqu'à présent de façon parcellaire, sur l'effet du Si sur l'induction de certains gènes cibles. Par ailleurs, peu d'études moléculaires sans *a priori* ont été réalisées afin de caractériser l'effet du Si sur l'expression du transcriptome complet. A titre d'exemple, une étude menée *via* une approche microArray a été réalisée par Watanabe et al., 2005 et montre qu'un apport de Si conduit à la modulation de l'expression de seulement 5 gènes chez *Oryza sativa*.

Face à ce constat, il a donc été entrepris de réaliser une approche moléculaire afin de caractériser, chez le colza, l'ensemble des gènes dont l'expression est modulée par un apport de 1,7 mM de Si pendant une semaine (Chapitre III, Figure III.3.2). Dans un premier temps, cette approche a été uniquement conduite au niveau racinaire puisque cet organe constitue le compartiment où s'accumule majoritairement le Si chez le colza (Chapitre III, Figure III.1.2).



Cette approche d'expression différentielle (transcriptome de racines contrôle *versus* racines traitées au Si) par « RNAsequencing (RNAseq) a été réalisée par la plateforme IPS2 de Saclay. Suite à la réception tardive des résultats de transcriptomiques, seule une analyse préliminaire est proposée dans le cadre de ce travail de thèse. Néanmoins, les premiers résultats montrent que de nombreux gènes sont modulés par le Si, contrairement à ce qui a pu être montré, chez le riz par **Watanabe et al. (2005)**. En effet, notre étude montre que le Si affecte l'expression racinaire de 1079 gènes, ce résultat est en accord avec une étude faite **Fauteux et al., 2006** sur des plantes d'*Arabidopsis thaliana* stressées par le mildiou, traitées ou non avec le Si, qui montre une modulation de l'expression de 4 000 gènes. Dans notre étude, de nombreux gènes impliqués dans la réponse au stress sont réprimés par le Si. Ces résultats sont surprenants dans la mesure ou dans la littérature, de nombreuses études montrent que l'expression de nombreux gènes de résistance aux stress est augmentée en réponse au Si (**Fauteux et al., 2006; Gao et al., 2007; Reynolds et al., 2009; Ali et al., 2018**).

Ainsi, Il peut être suggérer que ce résultat serait dû au fait que les plantes utilisées lors de notre expérimentation n'étaient pas cultivées en condition de stress. En effet, il est généralement admis que l'effet d'un apport de Si ne se manifeste que lorsque les plantes sont en situation de stress. De plus, l'induction de l'expression de nombreux gènes codant des protéines impliquées le renforcement de la paroi cellulaire a été observé dans les racines de plantes traitée au Si. Ce résultat est en accord avec des travaux montrant que le Si est largement impliqué dans le renforcement pariétal (**Guntzer et al., 2012b**). Cet épaissement de la paroi constituant un premier niveau de défense cellulaire (barrière physique), il pourrait en partie expliquer la répression des gènes de réponse au stress observée.

Bien que préliminaires, ces travaux confirment bien que chez le colza, le Si a en plus de son rôle mécanique, un rôle signalétique avéré.



# Chapitre V :

## Principales perspectives





# Chapitre V :

## Principales perspectives



## Chapitre V: Principales perspectives

Sur la base de ces travaux de thèse, plusieurs perspectives peuvent être envisagées afin de valider et/ou conforter certains résultats obtenus.

### **1-Approfondir et élargir les résultats issus de l'analyse transcriptomique différentielle:**

Concernant l'analyse du transcriptome racinaire, le RNAseq générant de nombreux faux positifs, il sera nécessaire de **valider rapidement l'expression des gènes impliqués dans des voies métaboliques clés** (renforcement pariétal, défense, statut redox) par Q-PCR.

Par ailleurs et compte-tenu des résultats obtenus au niveau foliaire (Article 1), **une analyse différentielle des transcriptomes des parties aériennes** sera également envisagée. Cette étude pourra être réalisée d'une part, à J0, afin de montrer l'effet du Si sur le transcriptome foliaire de plantes non stressées et d'autre part, à J12, afin de mieux appréhender les voies métaboliques impliquées dans la meilleure résistance des plantes prétraitées au Si au stress azoté.

### **2-Optimiser les apports de Si peut-il permettre un gain de rendement supérieur ?**

Dans notre étude en condition de plein champ, une dose unique de Si ( $12 \text{ kg Si ha}^{-1}$ ) a été apportée, ce qui ne permet pas de savoir si celle-ci correspond à la dose optimale conduisant à un gain de rendement maximal. Afin de répondre à cette question, un effet dose de Si sera envisagé en condition contrôlée à partir de plantes cultivées en présence de  $160 \text{ kg N ha}^{-1}$  dans des pots remplis d'un sol de même nature que celui contenu dans les cases lysimétriques. Au cours de cette expérimentation, les paramètres ayant attrait à la croissance, au rendement, et à la qualité de la graine feront l'objet d'une attention particulière.

### **3-Chez colza, les mécanismes d'acquisition du Si sont-ils similaires à ceux identifiés chez les plantes fortement accumulatrices comme le maïs ?**

Des travaux préliminaires réalisés dans le cadre de cette thèse n'ont pas permis de trouver des gènes orthologues aux gènes *Lsi1*, *Lsi2* et *Lsi6* identifiés chez d'autres espèces telles que le riz, le maïs ou l'orge. Toutefois, nos travaux confirment que le colza est bel et bien capable d'absorber le Si et de le stocker même si contrairement aux espèces accumulatrices, il stocke cet élément préférentiellement au niveau racinaire. Ces arguments suggèrent que colza présente peut-être des systèmes de transports différents à ceux identifiés chez les autres



plantes (accumulatrice notamment). Afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, nous nous proposons de caractériser l'absorption du Si grâce à l'utilisation d'isotopes stables du Si ( $\text{Si}^{29}$  ou  $\text{Si}^{30}$ ). De manière similaire à ce qui a pu être fait l'azote (**Lainé et al., 1995; Malagoli et al., 2004**), les cinétiques d'absorption du silicium marqué en fonction de sa concentration dans le milieu externe pourraient permettre de caractériser les systèmes de transport racinaires intervenant lors du prélèvement du Si. En parallèle, la même expérimentation réalisée chez le maïs permettra à partir des paramètres cinétiques obtenus (constante d'affinité et vitesse maximale d'absorption de Si) de vérifier si les systèmes d'absorption intervenant chez ces deux plantes, qui se différencient par une capacité d'accumulation du Si contrastée, sont identiques ou non.

Ce travail de recherche montre bien l'effet du Si sur la sénescence foliaire du colza qui est retardé de 2,6 jours. Afin de vérifier la généralité des effets observés chez le colza, une étude de l'impact d'un apport de Si peut être également étudié chez des plantes de grande culture fortement accumulatrice de Si telles que le maïs qui ne présente qu'une sénescence monocarpique contrairement au colza, présentant deux types de sénescence, séquentielle et monocarpique, au cours de son développement.

#### **4-Le Si présente-il un effet bénéfique sur la nutrition uréique du colza ?**

Un autre effet du Si qui est observé au cours de ces travaux de thèse est l'augmentation des teneurs en Ni dans les plantes traitées au Si (**Chapitre III, Figure III.2.5**). Ce résultat suscite un questionnement sur l'effet du Si les uréases *in planta* enzyme qui utilise le Ni comme cofacteur afin d'assurer l'hydrolyse de l'urée en ammonium. En effet, les uréases sont caractérisées par la présence d'un centre métallique dans leur site actif, qui requiert deux atomes de nickel indispensables à leurs activations (**Dixon et al., 1975**). Des études réalisées au laboratoire montrent que le colza se caractérise par une faible capacité d'absorption et d'assimilation de l'urée (**Arkoun et al., 2012**). Ce défaut d'assimilation s'explique notamment par une faible activité des uréases endogènes qui peut être potentialisée par un apport de Ni (**Arkoun et al., 2013**).

Afin de répondre à cette question, une expérimentation en condition contrôlée sur des plantes de colza cultivées en présence (ou non) de Si avec de l'urée sera envisagée. Chez ces plantes, l'effet du Si sur l'utilisation de l'urée par le colza sera recherchée en suivant (i)



l'activité des uréases foliaires et racinaires (dosage d'ammonium et d'urée) et (ii) l'expression des gènes codant ces uréases. Par ailleurs, le suivi de la croissance, les teneurs en chlorophylles, le suivi de la progression de la sénescence foliaire ainsi que l'étude de marqueurs de stress oxydatif (MDA et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) permettra d'évaluer si un apport de Si permet à la plante de mieux supporter le stress lié à l'alimentation uréique.

### **5-Un apport de Si peut-il permettre d'optimiser les performances des associations fabacées-colza ?**

Chez les fabacées, la nodulation et la fixation du diazote atmosphérique (N<sub>2</sub>) nécessitent un apport suffisant en macro et micronutriments (**Smith, 1982**). Cependant, peu d'études concernent le rôle du Si sur ces processus et notamment sur la croissance des nodules et la fixation de l'azote. En effet, la majorité des études portant sur les fabacées étudié l'effet du Si sur la croissance des plantes et non sur ses performances de fixation de N<sub>2</sub>.

A notre connaissance, seules quelques études montrent un effet bénéfique du Si sur la nodulation notamment chez le niébé (*Vigna unguiculata*) (**Mali et Aery, 2008; Johnson et al., 2017; Izaguirre-Mayoral et al., 2017**). Par ailleurs, une étude réalisée par **Nelwamondo et Dakora (1999)** montre une augmentation significative de la biomasse racinaire, du nombre de nodules et de leur matière sèche mais également du N<sub>2</sub> fixé par les plantes de niébé inoculées avec une souche de *Bradyrhizobium*.

De plus, les fabacées contribuent à l'enrichissement du sol en azote *via* la rhizodéposition de composés azotés provenant de la fixation de N<sub>2</sub> mais également de la minéralisation de la nécromasse racinaire et de la litière (**Høgh-Jensen et Schjoerring, 2001**). A titre d'exemple, des études menées sur l'association fabacées-poacées montrent que les fabacées enrichissent le sol en azote *via* la rhizodéposition (**Ledgard et Steele, 1992; Paynel et al., 2001**), cet azote organique étant disponible pour la poacées compagne. Ce processus de transfert d'azote entre plantes compagnes a notamment été étudié dans le cadre de nouvelles associations fabacées-colza. Ainsi, au sein de ces associations, une étude menée par **Génard et al. (2016)** a permis de montrer que le trèfle incarnat (*Trifolium incarnatum* L.) présentait une rhizodéposition particulièrement efficace pour permettre des transferts d'azote vers le colza. Au vu de ces résultats, une étude visant, dans un premier temps, à caractériser l'effet d'un





apport de Si sur les capacités de fixation du N<sub>2</sub> et d'exsudation du trèfle incarnat serait particulièrement intéressante.

L'effet du Si sur les capacités de fixation de N<sub>2</sub> du trèfle sera évalué *via* (i) un marquage <sup>15</sup>N<sub>2</sub> réalisé par exemple en collaboration avec l'UMR AgroEcologie de Dijon qui possède les infrastructures et les compétences nécessaires et (ii) des analyses isotopiques d'azote (Plateforme PLATIN', Université de Caen) réalisées respectivement *in planta* et sur le sol afin d'évaluer les capacités de fixation et d'exsudation du trèfle traité ou non avec du Si. A l'issue de cette expérimentation, les plantes seront récoltées afin d'évaluer l'impact d'un apport de Si sur la croissance du trèfle, sur le nombre de nodules, la teneur en leghémoglobine et l'activité nitrogénase.

Dans un second temps, un apport de Si sera testé sur le fonctionnement de cette association trèfle-colza. En effet, des travaux réalisés au laboratoire (**Génard, 2016 et 2017**) ont montré une augmentation des capacités de fixation du N<sub>2</sub> atmosphérique des fabacées (trèfle, lupin, vesce) cultivées en association avec le colza. Cette augmentation peut s'expliquer, pour partie, par les fortes capacités d'absorption d'azote nitrique du colza qui conduisent à une diminution des teneurs en nitrate du sol, une forme d'azote connue pour diminuer les capacités de fixation des fabacées *via* l'inhibition de l'activité nitrogénase des nodules (**Génard, 2016**). Considérant les résultats obtenus récemment et montrant un effet bénéfique du Si sur le prélèvement d'azote du colza, il peut être suggéré que l'apport de Si potentialise l'effet sur la fixation du N<sub>2</sub> du trèfle lorsque celui-ci est cultivé en association. Afin d'évaluer cet effet, une association colza-trèfle (traitée ou non au Si) fertilisée avec du K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub> sera cultivée en conditions contrôlées dans des pots remplis de sol inoculé avec une suspension de rhizobium. Ce marquage nous permettra d'évaluer précisément l'impact du Si sur l'absorption de l'azote du colza et sur les capacités de fixation du N<sub>2</sub> atmosphérique par le trèfle cultivé en association.



# Chapitre VI :

## Références bibliographiques



# Chapitre VI :

## Références bibliographiques



## Chapitre VI: Références bibliographiques

[www.terresinovia.fr](http://www.terresinovia.fr)

<http://www.fopoleopro.com/marche-mondial-oleoproteagineux-decembre-2017/>

[www.fao.org](http://www.fao.org)

<http://www.terresoleopro.com/colza-une-jolie-tete-de-rotation>

---

### A

---

Abbaspour, N., Hurrell, R., Kelishadi, R. (2014). Review on iron and its importance for human health. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 19, 164.

Abeles, F. B., Dunn, L. J., Morgens, P., Callahan, A., Dinterman, R. E., & Schmidt, J. (1988). Induction of 33-kD and 60-kD peroxidases during ethylene-induced senescence of cucumber cotyledons. *Plant physiology*, 87(3), 609-615.

Adatia, M.H., and Besford, R.T. (1986). The effects of silicon on cucumber plants grown in recirculating nutrient solution. *Annals of Botany*. 58,343-351.

Agarie, S., Uchida, H., Agata, W., Kubota, F., & Kaufman, P. B. (1998). Effects of silicon on transpiration and leaf conductance in rice plants (*Oryza sativa* L.). *Plant Production Science*, 1(2), 89-95.

Ahmad, P., & Prasad, M. N. V. (Eds.). (2011). Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change. *Springer Science & Business Media*.

Ahmad, P., Jaleel, C. A., Salem, M. A., Nabi, G., & Sharma, S. (2010). Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical reviews in biotechnology*, 30(3), 161-175.

Ali, N., Schwarzenberg, A., YVIN, J. C., & Hosseini, S. A. (2018). Regulatory Role of Silicon in Mediating Differential Stress Tolerance Responses in Two Contrasting Tomato Genotypes Under Osmotic Stress. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1475.

Allen L. (2006). World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations Guidelines on food fortification with micronutrients. *Geneva; Rome: World Health Organization; Food and Agriculture Organization of the United Nations*.

Aoyama, S., Huarancca Reyes, T., Guglielminetti, L., Lu, Y., Morita, Y., Sato, T., & Yamaguchi, J. (2014). Ubiquitin ligase ATL31 functions in leaf senescence in response to the balance





between atmospheric CO<sub>2</sub> and nitrogen availability in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 55(2), 293-305.

Arkoun, M., Jannin, L., Laîné, P., Etienne, P., Masclaux-Daubresse, C., Citerne, S., ... & Ourry, A. (2013). A physiological and molecular study of the effects of nickel deficiency and phenylphosphorodiamidate (PPD) application on urea metabolism in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant and soil*, 362(1-2), 79-92.

Arkoun, M., Sarda, X., Jannin, L., Laîné, P., Etienne, P., Garcia-Mina, J. M., ... & Ourry, A. (2012). Hydroponics versus field lysimeter studies of urea, ammonium and nitrate uptake by oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of experimental botany*, 63(14), 5245-5258.

Avice, J. C., & Etienne, P. (2014). Leaf senescence and nitrogen remobilization efficiency in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of experimental botany*, 65(14), 3813-3824.

Azeem M, Iqbal N, Kausar S, Javed MT, Akram MS, Sajid MA. (2015). Efficacy of silicon priming and fertigation to modulate seedling's vigor and ion homeostasis of wheat (*Triticum aestivum* L.) under saline environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 14367-14371.

---

## B

---

Balasta, M. L. F., Perez, C. M., Juliano, B. O., Villareal, C. P., Lott, J. N., & Roxas, D. B. (1989). Effects of silica level on some properties of *Oryza sativa* straw and hull. *Canadian Journal of Botany*, 67(8), 2356-2363.

Barberon, M., Vermeer, J. E. M., De Bellis, D., Wang, P., Naseer, S., Andersen, T. G., ... & Geldner, N. (2016). Adaptation of root function by nutrient-induced plasticity of endodermal differentiation. *Cell*, 164(3), 447-459.

Bauer, P., Elbaum, R., & Weiss, I. M. (2011). Calcium and silicon mineralization in land plants: transport, structure and function. *Plant Science*, 180(6), 746-756.

Bhattacharjee, S. (2005). Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science*, 1113-1121.

Billard, V., Etienne, P., Jannin, L., Garnica, M., Cruz, F., Garcia-Mina, J. M., ... & Ourry, A. (2014). Two biostimulants derived from algae or humic acid induce similar responses in the mineral content and gene expression of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of plant growth regulation*, 33(2), 305-316.

Biswal, B., Mohapatra, P. K., Biswal, U. C., & Raval, M. K. (2012). Leaf senescence and transformation of chloroplasts to gerontoplasts. In *Photosynthesis* (pp. 217-230). Springer, Dordrecht.



Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.

Broadley, M., Brown, P., Cakmak, I., Rengel, Z., & Zhao, F. (2012). Function of nutrients: micronutrients. In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants (Third Edition)*, 191-248.

Brunings AM, Datnoff LE, Ma JF, Mitani N, Nagamura Y, Rathinasabapathi B, Kirst M. (2009). Differential gene expression of rice in response to silicon and rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Annals of Applied Biology*, 155 (2), 161-170

Buchanan-Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., Mathas, E., Navabpour, S., Page, T., & Pink, D. (2003). The molecular analysis of leaf senescence—a genomics approach. *Plant biotechnology journal*, 1(1), 3-22.

Bybordi, A. (2012). Effect of ascorbic acid and silicium on photosynthesis, antioxidant enzyme activity, and fatty acid contents in canola exposure to salt stress. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(10), 1610-1620.

---

## C

---

Casey, W. H., Kinrade, S. D., Knight, C. T. G., Rains, D. W., & Epstein, E. (2004). Aqueous silicate complexes in wheat, *Triticum aestivum* L. *Plant, Cell & Environment*, 27(1), 51-54.

Chain F, Côté-Beaulieu C, Belzile F, Menzies JG, Bélanger RR. (2009). A comprehensive transcriptomic analysis of the effect of silicon on wheat plants under control and pathogen stress conditions. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 22, 1323-1330.

Chen, D., Cao, B., Wang, S., Liu, P., Deng, X., Yin, L., & Zhang, S. (2016). Silicon moderated the K deficiency by improving the plant-water status in sorghum. *Scientific reports*, 6, 22882.

Cheong, Y. W. Y., & Chan, P. Y. (1973). Incorporation of P<sup>32</sup> in phosphate esters of the sugar cane plant and the effect of Si and Al on the distribution of these esters. *Plant and Soil*, 38(1), 113-123.

Cho, K., Mabasa, L., Fowler, A. W., Walsh, D. M., & Park, C. S. (2010). Canola oil inhibits breast cancer cell growth in cultures and in vivo and acts synergistically with chemotherapeutic drugs. *Lipids*, 45(9), 777-784.

Choi, D. S., & Hwang, B. K. (2011). Proteomics and functional analyses of pepper abscisic acid-responsive 1 (ABR1), which is involved in cell death and defense signaling. *The Plant Cell*, 23(2), 823-842.



Chory, J., Reinecke, D., Sim, S., Washburn, T., Brenner, M. (1994). A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis* (det mutants have an altered response to cytokinins). *Annual Review of Plant Physiology*, 104, 339–347.

Christiansen, M.W., Gregersen, P.L. (2014). Members of the barley NAC transcription factor gene family show differential co-regulation with senescence-associated genes during senescence of flag leaves. *Journal of Experimental Botany*, 65, 4009-4022.

Collier, M.D., Fotelli, M., Nahm, M., Kopriva, S., Rennenberg, D.E., Gessler, A. (2003). Regulation of nitrogen uptake by *Fagus sylvatica* on a whole plant level-interactions between cytokinins and soluble N compounds. *Plant Cell Environment*, 26, 1549-1560

Coskun, D., Britto, D. T., Huynh, W. Q., & Kronzucker, H. J. (2016). The role of silicon in higher plants under salinity and drought stress. *Frontiers in plant science*, 7, 1072.

Coskun, D., Deshmukh, R., Sonah, H., Menzies, J. G., Reynolds, O., Ma, J. F., ... & Bélanger, R. R. (2019). The controversies of silicon's role in plant biology. *New Phytologist*, 221(1), 67-85.

Côté-Beaulieu, C., Chain, F., Menzies, J. G., Kinrade, S. D., & Bélanger, R. R. (2009). Absorption of aqueous inorganic and organic silicon compounds by wheat and their effect on growth and powdery mildew control. *Environmental and experimental botany*, 65(2), 155-161.

Crawford, N. M., & Forde, B. G. (2002). Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. *The arabidopsis book*, e0011.

---

## D

---

Da Cunha, K.P.V., and Do Nascimento, C.W.A. (2009). Silicon effects on metal tolerance and structural changes in maize (*Zea mays* L.) grown on a cadmium and zinc enriched soil. *Water Air and Soil Pollution*. 197,323–330.

Dai, N., Schaffer, A., Petreikov, M., Shahak, Y., Giller, Y., Ratner, K., Levine, A., Granot, D. (1999). Overexpression of *Arabidopsis* hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *The Plant Cell*, 11, 1253–1266.

Dai, W. M., Zhang, K. Q., Duan, B. W., Sun, C. X., Zheng, K. L., Cai, R., & Zhuang, J. Y. (2005). Rapid determination of silicon content in rice. *Rice Sci*, 12(2), 145-7.

Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2, 53.

Datnoff, L. E., Snyder, G. H., & Korndörfer, G. H. (Eds.). (2001). *Silicon in agriculture* (Vol. 8). Elsevier.



- Datnoff, L.E., Deren, C.W., Snyder, G.H. (1997): Silicon fertilization for disease management of rice in Florida. *Crop Prot*, 16, 525–31.
- De Almeida, G. D. (2008). Calcium silicate and organic mineral fertilizer applications reduce phytophagy by *Trips palmi karny* (thysanoptera: thripidae) on eggplants (*Solanum melongena* L.). *Interciencia*, 33(11), 835-838
- Deer, W. A., Howie, R. A., & Zussman, J. (1992). An introduction to the rock-forming minerals (Vol. 696). Hong Kong: *Longman Scientific & Technical*.
- Del Rio, L.A., Sandalio, L.M., Altomare, D.A., Zilinskas, B.A. (2003). Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *Journal of Experimental Botany*, 54, 923-933.
- Desclos, M. (2008). Modifications physiologique et protéomique associées à la remobilisation de l'azote foliaire au cours de la senescence séquentielle chez le colza (*Brassica napus* L.) (Doctoral dissertation, Université de Caen).
- Desclos, M., Dubousset, L., Etienne, P., Le Caherec, F., Satoh, H., Bonnefoy, J., ... & Avice, J. C. (2008). A proteomic profiling approach to reveal a novel role of *Brassica napus* drought 22 kD/water-soluble chlorophyll-binding protein in young leaves during nitrogen remobilization induced by stressful conditions. *Plant Physiology*, 147(4), 1830-1844.
- Desclos-Theveniau, M., Coquet, L., Jouenne, T., Etienne, P. (2015). Proteomic analysis of residual proteins in blades and petioles of fallen leaf of *Brassica napus*. *Plant Biology*, 17,408-418
- Detmann, K.C., Araújo, W.L., Martins, S.C., Sanglard, L.M, Reis, J.V., Detmann, E., *et al.* (2012). Silicon nutrition increases grain yield, which in turn, exerts a feed-forward stimulation of photosynthetic rates via enhanced mesophyll conductance and alters primary metabolism in rice. *New Phytologist*, 196 (3), 752-62.
- Dixon, N.E., Gazzola, C., Blakely, R.L., Zerner, B. (1975). Jack-bean urease (E.C. 3.5.1.5.3). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel. *Journal of the American Chemical Society*, 97, 4131-4133.
- Dluzniewska, P., Gessler, A., Kopriva, S., Strnad, M., Novák, O., Dietrich ,H., *et al.* (2006). Exogenous supply of glutamine and active cytokinin to the roots reduces NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake rates in poplar. *Plant Cell Environment*, 27,1284-1297
- Dubousset, L., Abdallah, M., Desfeux, A. S., Etienne, P., Meuriot, F., Hawkesford, M. J., ... & Bonnefoy, J. (2009). Remobilization of leaf S compounds and senescence in response to restricted sulphate supply during the vegetative stage of oilseed rape are affected by mineral N availability. *Journal of Experimental Botany*, 60(11), 3239-3253.





Dubousset, L., Etienne, P., & Avice, J. C. (2010). Is the remobilization of S and N reserves for seed filling of winter oilseed rape modulated by sulphate restrictions occurring at different growth stages?. *Journal of experimental botany*, 61(15), 4313-4324.

---

## E

---

Edgar, R., Domrachev, M., & Lash, A. E. (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic acids research*, 30(1), 207-210.

Ellis, C. M., Nagpal, P., Young, J. C., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., & Reed, J. W. (2005). AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 132(20), 4563-4574.

Eneji, A. E., Inanaga, S., Muranaka, S., Li, J., Hattori, T., An, P., & Tsuji, W. (2008). Growth and nutrient use in four grasses under drought stress as mediated by silicon fertilizers. *Journal of Plant Nutrition*, 31(2), 355-365.

Epstein, E. & Bloom, A. J. (2003). Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives, 2nd edn, *John Wiley & Sons*, New York.

Epstein, E. (1994). The anomaly of silicon in plant biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(1), 11-17.

Epstein, E. (1999). Silicon. *Annual review of plant biology*, 50(1), 641-664

Epstein, E. (2001). Silicon in plants: facts vs. concepts. *In Studies in Plant Science* (Vol. 8, pp. 1-15). Elsevier.

Epstein, E., & Bloom, A. J. (2005). Inorganic components of plants. *Mineral nutrition of plants: principles and perspectives, 2nd edn. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts*, 44-45.

Etesami, H., & Jeong, B. R. (2018). Silicon (Si): Review and future prospects on the action mechanisms in alleviating biotic and abiotic stresses in plants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 147, 881-896.

Etienne, P., Desclos, M., Le Gou, L., Gombert, J., Bonnefoy, J., Maurel, K., Le Dily, F., Ourry, A., Avice, J.C. (2007). N-protein mobilisation associated with the leaf senescence process in oilseed rape is concomitant with the disappearance of trypsin inhibitor activity. *Functional Plant Biology*, 34, 895-906.

---

## F

---

Farooq, M. A., & Dietz, K. J. (2015). Silicon as versatile player in plant and human biology: overlooked and poorly understood. *Frontiers in plant science*, 6, 994.



Farshidi, M., Abdolzadeh, A., Sadeghipour, H.R. (2012). Silicon nutrition alleviates physiological disorders imposed by salinity in hydroponically grown canola (*Brassica napus* L.) plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34, 1779-1788.

Fauteux, F., Chain, F., Belzile, F., Menzies, J.G., Bélanger, R.R. (2006). The protective role of silicon in the *Arabidopsis*-powdery mildew pathosystem. *The National Academy of Sciences of the USA*, 103, 17554–17559.

Fauteux, F., Rémus-Borel, W., Menzies, J. G., & Bélanger, R. R. (2005). Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiology letters*, 249(1), 1-6.

Fawe, A., Menzies, J. G., Chérif, M., & Bélanger, R. R. (2001). Silicon and disease resistance in dicotyledons. In *Studies in Plant Science* (Vol. 8, pp. 159-169). Elsevier.

Feng, H., Yan, M., Fan, X., Li, B., Shen, Q., Miller, A.J., *et al.* (2011). Spatial expression and regulation of rice high-affinity nitrate transporters by nitrogen and carbon status. *Journal of Experimental Botany*, 62, 2319-2332.

Fischer, A.M. (2012). The Complex Regulation of Senescence. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31, 124-147.

Fleck, A. T., Nye, T., Repenning, C., Stahl, F., Zahn, M., & Schenk, M. K. (2010). Silicon enhances suberization and lignification in roots of rice (*Oryza sativa*). *Journal of Experimental Botany*, 62(6), 2001-2011.

Fortunato, A. A., Debona, D., Bernardeli, A., & Rodrigues, F. A. (2015). Defence-Related Enzymes in Soybean Resistance to Target Spot. *Journal of Phytopathology*, 163(9), 731-742.

Frew, A., Weston, L. A., Reynolds, O. L., & Gurr, G. M. (2018). The role of silicon in plant biology: a paradigm shift in research approach. *Annals of botany*, 121(7), 1265-1273.

---

## G

---

Gagnot, S., Tamby, J. P., Martin-Magniette, M. L., Bitton, F., Taconnat, L., Balzergue, S., ... & Brunaud, V. (2007). CATdb: a public access to Arabidopsis transcriptome data from the URGV-CATMA platform. *Nucleic Acids Research*, 36(suppl\_1), D986-D990.

Gan, S. (1995). Molecular characterization and genetic manipulation of plant senescence. (Doctoral dissertation, University of Wisconsin, Madison).

Gan, S., & Amasino, R. M. (1995). Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, 270(5244), 1986-1988.

Gan, S., Amasino, R.M. (1997). Making sense of senescence. Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiology*, 113, 313-319.



Gao, X., Zou, C., Wang, L., & Zhang, F. (2006). Silicon decreases transpiration rate and conductance from stomata of maize plants. *Journal of Plant Nutrition*, 29(9), 1637-1647.

Génard, T. (2016). Potentiel agronomique et environnemental des associations Fabacées-colza (Doctoral dissertation, Caen).

Génard, T., Etienne, P., Diquélou, S., Yvin, J. C., Revellin, C., & Laîné, P. (2017). Rapeseed-legume intercrops: plant growth and nitrogen balance in early stages of growth and development. *Heliyon*, 3(3), e00261.

Génard, T., Etienne, P., Laîné, P., Yvin, J. C., & Diquélou, S. (2016). Nitrogen transfer from *Lupinus albus* L., *Trifolium incarnatum* L. and *Vicia sativa* L. contribute differently to rapeseed (*Brassica napus* L.) nitrogen nutrition. *Heliyon*, 2(9), e00150.

Gessler, A., Rennenberg, H., Kopriva, S. (2004). Regulation of nitrate uptake on the whole plant level: interactions between nitrogen compounds, cytokinins and carbon metabolism. *Tree Physiology*, 24, 1313-1321.

Ghareeb, H., Bozs, Z., Ott, P.G., Wydra, K. (2011). Silicon and *Ralstonia solanacearum* modulate expression stability of housekeeping genes in tomato. *Physiological and molecular plant pathology*, 75 (4), 176-179.

Girondé, A., Etienne, P., Trouverie, J., Bouchereau, A., Le Cahérec, F., Leport, L., ... & Soulay, F. (2015). The contrasting N management of two oilseed rape genotypes reveals the mechanisms of proteolysis associated with leaf N remobilization and the respective contributions of leaves and stems to N storage and remobilization during seed filling. *BMC plant biology*, 15(1), 59.

Golczyk, H., Greiner, S., Wanner, G., Weihe, A., Bock, R., Börner, T., & Herrmann, R. G. (2014). Chloroplast DNA in mature and senescing leaves: a reappraisal. *The Plant Cell*, 26(3), 847-854.

Gombert, J., Etienne, P., Ourry, A., & Le Dily, F. (2006). The expression patterns of *SAG12/Cab* genes reveal the spatial and temporal progression of leaf senescence in *Brassica napus* L. with sensitivity to the environment. *Journal of Experimental Botany*, 57(9), 1949-1956.

Gombert, J., Le Dily, F., Lothier, J., Etienne, P., Rossato, L., Allirand, J. M., ... & Ourry, A. (2010). Effect of nitrogen fertilization on nitrogen dynamics in oilseed rape using <sup>15</sup>N-labeling field experiment. *Journal of plant nutrition and soil science*, 173(6), 875-884.

Gong, H. J., Chen, K. M., Chen, G. C., Wang, S. M., & Zhang, C. L. (2003). Effects of silicon on growth of wheat under drought. *Journal of Plant Nutrition*, 26(5), 1055-1063.



- Gong, H. J., Randall, D. P., & Flowers, T. J. (2006). Silicon deposition in the root reduces sodium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings by reducing bypass flow. *Plant, Cell & Environment*, 29(10), 1970-1979.
- Gong, H., & Chen, K. (2012). The regulatory role of silicon on water relations, photosynthetic gas exchange, and carboxylation activities of wheat leaves in field drought conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(4), 1589-1594.
- Good, A. G., & Beatty, P. H. (2011). Biotechnological approaches to improving nitrogen use efficiency in plants: alanine aminotransferase as a case study. *The molecular and physiological basis of nutrient use efficiency in crops*, 165-191.
- Good, A. G., Shrawat, A. K., & Muench, D. G. (2004). Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production?. *Trends in plant science*, 9(12), 597-605.
- Gottardi, S., Iacuzzo, F., Tomasi, N., Cortella, G., Manzocco, L., Pinton, R., et al. (2012). Beneficial effects of silicon on hydroponically grown corn salad (*Valerianella locusta* (L.) Laterr) plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 56,14-23.
- Grbić, V., & Bleecker, A. B. (1995). Ethylene regulates the timing of leaf senescence in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 8(4), 595-602.
- Gregersen, P. L. (2011). Senescence and nutrient remobilization in crop plants. *The molecular and physiological basis of nutrient use efficiency in crops*, 83-102.
- Gregersen, P. L., Culetic, A., Boschian, L., & Krupinska, K. (2013). Plant senescence and crop productivity. *Plant Molecular Biology*, 82(6), 603-622.
- Gregersen, P. L., Holm, P. B., & Krupinska, K. (2008). Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. *Plant Biology*, 10(s1), 37-49.
- Grégoire, C., Rémus-Borel, W., Vivancos, J., Labbé, C., Belzile, F., & Bélanger, R. R. (2012). Discovery of a multigene family of aquaporin silicon transporters in the primitive plant *Equisetum arvense*. *The Plant Journal*, 72(2), 320-330.
- Guérin, V. (2014). Effets du silicium dans la réduction du stress biotique causé par *Phytophthora sojae* chez le soya évalué grâce à une nouvelle méthode d'inoculation par zoospores.
- Guerriero, G., Hausman, J. F., & Legay, S. (2016). Silicon and the plant extracellular matrix. *Frontiers in plant science*, 7, 463.





Guével, M. H., Menzies, J. G., & Bélanger, R. R. (2007). Effect of root and foliar applications of soluble silicon on powdery mildew control and growth of wheat plants. *European Journal of Plant Pathology*, 119(4), 429-436.

Guntzer, F., Keller, C., & Meunier, J. D. (2012a). Benefits of plant silicon for crops: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(1), 201-213.

Guntzer, F., Keller, C., Poulton, P. R., McGrath, S. P., & Meunier, J. D. (2012b). Long-term removal of wheat straw decreases soil amorphous silica at Broadbalk, Rothamsted. *Plant and soil*, 352(1-2), 173-184.

Guo, Y., Gan, S.S. (2005). Leaf senescence: signals, execution, and regulation. *Current Topic in Developmental Biology*, 71, 83-112.

---

## H

---

Habibi, G. (2016). Effect of foliar-applied silicon on photochemistry, antioxidant capacity and growth in maize plants subjected to chilling stress. *Acta Agriculturae Slovenica*, 107(1), 33-43.

Haddad, C., Arkoun, M., Jamois, F., SCHAWARZBENBERG, A., Yvin, J. C., Etienne, P., & Laîné, P. (2018). Silicon Promotes Growth of *Brassica napus* L. and Delays Leaf Senescence Induced by Nitrogen Starvation. *Frontiers in plant science*, 9, 516.

Hallmark, C.T., Wilding, L.P., Smeck, N.E. (1982). Silicon. In: Page AL, Miller RH, Keeney DR, editors. *Methods of soil analysis. Part 2: Chemical and microbiological properties*, Agronomy monograph no. 9. 2nd ed. Madison: The America Society of Agronomy and Soil Science Society of America, 263–73.

Hasanuzzaman, M., & Fujita, M. (2011). Selenium pretreatment upregulates the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system and confers enhanced tolerance to drought stress in rapeseed seedlings. *Biological Trace Element Research*, 143(3), 1758-1776.

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Anee, T. I., & Fujita, M. (2017). Exogenous silicon attenuates cadmium-induced oxidative stress in *Brassica napus* L. by modulating AsA-GSH pathway and glyoxalase system. *Frontiers in plant science*, 8, 1061.

Hashemi, A., Abdolzadeh, A., Sadeghipour, H.R. (2010). Beneficial effects of silicon nutrition in alleviating salinity stress in hydroponically grown canola, *Brassica napus* L., plants. *Soil Science and Plant Nutrition*, 56,244–253.

Hattori, T., Inanaga, S., Tanimoto, E., Lux, A., Luxová, M., Sugimoto, Y. (2003). Silicon-Induced Changes in Viscoelastic Properties of Sorghum Root Cell Walls. *Plant Cell Physiology*, 44(7), 743-749.



- Hattori, T., Sonobe, K., Inanaga, S., An, P., Morita, S. (2008). Effects of silicon on photosynthesis of young cucumber seedlings under osmotic stress. *J Plant Nutr*, 31, 1046–1058.
- Hayashi, M., Toriyama, K., Kondo, M., Kato, A., Mano, S., De Bellis, L., Hayashi-Ishimaru, Y., Yamaguchi, K., Hayashi, H., Nishimura, M. (2000). Functional transformation of plant peroxisomes. *Cell biochemistry and biophysics*, 32(1-3), 295-304.
- He, Y., Fukushige, H., Hildebrand, D. F., & Gan, S. (2002). Evidence supporting a role of jasmonic acid in Arabidopsis leaf senescence. *Plant physiology*, 128(3), 876-884.
- Hensel, L. L., Grbić, V., Baumgarten, D. A., & Bleecker, A. B. (1993). Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 5(5), 553-564.
- Hinderhofer, K., Zentgraf, U. (2001). Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. *Planta*, 213, 469-473.
- Hodson, M. J., White, P. J., Mead, A., & Broadley, M. R. (2005). Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. *Annals of botany*, 96(6), 1027-1046.
- Høgh-Jensen, H., & Schjoerring, J. K. (2001). Rhizodeposition of nitrogen by red clover, white clover and ryegrass leys. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(4-5), 439-448.
- Hong, S.B., Sexton, R., Tucker, M.L. (2000). Analysis of gene promoters for two tomato polygalacturonases expressed in abscission zones and the stigma. *Plant Physiology*, 123, 869-881.
- Hörtensteiner, S., & Feller, U. (2002). Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Botany*, 53, 927-937.
- Hörtensteiner, S., & Kräutler, B. (2011). Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(8), 977-988.
- Hossain, M.T., Soga, K., Wakabayashi, K., Kamisaka, S., Fujii, S., Yamamoto, R., Hoson, T. (2007). Modification of chemical properties of cell walls by silicon and its role in regulation of the cell wall extensibility in oat leaves. *Journal of Plant Physiology*, 164(4), 385-393.
- Hou, K., Wu W., Gan, S.S. (2013). SAUR36, a SMALL AUXIN UP RNA gene, is involved in the promotion of leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 161, 1002–1009.
- Huang, C.H., Roberts, P.D., Datnoff, L.E. (2011). Silicon suppresses Fusarium crown and root rot of tomato. *J. Phytopathol*, 159, 546–554.
- Hwang, I., Sheen, J., Mueller, B. (2012). Cytokinin signaling networks. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 353–380.



## I

Ilami, G., Nespoulous, C., Huet, J. C., Vartanian, N., & Pernollet, J. C. (1997). Characterization of BnD22, a drought-induced protein expressed in *Brassica napus* leaves. *Phytochemistry*, 45(1), 1-8.

Ile, E. I., Craufurd, P. Q., Battey, N. H., & Asiedu, R. (2006). Phases of dormancy in yam tubers (*Dioscorea rotundata*). *Annals of botany*, 97(4), 497-504.

Inal, M. E., Kanbak, G., & Sunal, E. (2001). Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clinica Chimica Acta*, 305(1-2), 75-80.

Ishiguro, K. (2001). Review of research in Japan on the roles of silicon in conferring resistance against rice blast. *Studies in plant science*. 8,277-291.

Izaguirre-Mayoral, M. L., Brito, M., Baral, B., & Garrido, M. J. (2017). Silicon and Nitrate Differentially Modulate the Symbiotic Performances of Healthy and Virus-Infected Bradyrhizobium-nodulated Cowpea (*Vigna unguiculata*), Yardlong Bean (*V. unguiculata* subsp. *sesquipedalis*) and Mung Bean (*V. radiata*). *Plants*, 6(3), 40.

## J

Jajic, I., Sarna, T., & Strzalka, K. (2015). Senescence, stress, and reactive oxygen species. *Plants*, 4(3), 393-411.

Jannin, L., Arkoun, M., Ourry, A., Laîné, P., Goux, D., Garnica, M., ... & Houdusse, F. (2012). Microarray analysis of humic acid effects on *Brassica napus* growth: involvement of N, C and S metabolisms. *Plant and soil*, 359(1-2), 297-319.

Johnson, S. N., Hartley, S. E., Ryalls, J. M., Frew, A., DeGabriel, J. L., Duncan, M., & Gherlenda, A. N. (2017). Silicon-induced root nodulation and synthesis of essential amino acids in a legume is associated with higher herbivore abundance. *Functional ecology*, 31(10), 1903-1909.

Jones, B., Gunneras, S. A., Petersson, S. V., Tarkowski, P., Graham, N., May, S., Dolezal, K., Sandberg, G., Ljung, K. (2010). Cytokinin regulation of auxin synthesis in *Arabidopsis* involves a homeostatic feedback loop regulated via auxin and cytokinin signal transduction. *The Plant Cell*, 22(9), 2956-2969.

Jones, L. H. P., & Handreck, K. A. (1967). Silica in soils, plants, and animals. In *Advances in agronomy* (Vol. 19, pp. 107-149). Academic Press.



---

**K**

---

Kant, S., Bi, Y. M., & Rothstein, S. J. (2010). Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. *Journal of experimental botany*, 62(4), 1499-1509.

Keeping, M.G., Reynolds, O.L. (2009). Silicon in agriculture: new insights, new significance and growing application. *Annals of Applied Biology*, 155 (2), 153-154.

Khan, M., Rozhon, W., & Poppenberger, B. (2014). The role of hormones in the aging of plants- a mini-review. *Gerontology*, 60(1), 49-55.

Khanna-Chopra, R. (2012). Leaf senescence and abiotic stresses share reactive oxygen species-mediated chloroplast degradation. *Protoplasma*, 249(3), 469-481.

Kim, J. I., Murphy, A. S., Baek, D., Lee, S. W., Yun, D. J., Bressan, R. A., & Narasimhan, M. L. (2011). YUCCA6 over-expression demonstrates auxin function in delaying leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*, 62(11), 3981-3992.

Kim, S. G., Kim, K. W., Park, E. W., & Choi, D. (2002). Silicon-induced cell wall fortification of rice leaves: a possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. *Phytopathology*, 92(10), 1095-1103.

Kim, Y. H., Khan, A. L., Waqas, M., & Lee, I. J. (2017). Silicon regulates antioxidant activities of crop plants under abiotic-induced oxidative stress: a review. *Frontiers in plant science*, 8, 510.

Kim, Y. H., Khan, A. L., Waqas, M., Shim, J. K., Kim, D. H., Lee, K. Y., & Lee, I. J. (2014). Silicon application to rice root zone influenced the phytohormonal and antioxidant responses under salinity stress. *Journal of plant growth regulation*, 33(2), 137-149.

Koeslin-Findeklee, F., Rizi, V. S., Becker, M. A., Parra-Londono, S., Arif, M., Balazadeh, S., ... & Horst, W. J. (2015). Transcriptomic analysis of nitrogen starvation-and cultivar-specific leaf senescence in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant science*, 233, 174-185.

Kopylova, E., Noé, L., & Touzet, H. (2012). SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics*, 28(24), 3211-3217.

Korndörfer, G. H., & Lepsch, I. (2001). Effect of silicon on plant growth and crop yield. In *Studies in plant science (Vol. 8, pp. 133-147)*. Elsevier.

Koyro, H. W., Ahmad, P., & Geissler, N. (2012). Abiotic stress responses in plants: an overview. In *Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change* (pp. 1-28). Springer, New York, NY.





Kuai, J., Sun, Y., Guo, C., Zhao, L., Zuo, Q., Wu, J., Zhou, G. (2017). Root-applied silicon in the early bud stage increases the rapeseed yield and optimizes the mechanical harvesting characteristics. *Field Crops Research*, 200, 88-97.

Kumar, P. A., Parry, M. A., Mitchell, R. A., Ahmad, A., & Abrol, Y. P. (2002). Photosynthesis and nitrogen-use efficiency. In *Photosynthetic nitrogen assimilation and associated carbon and respiratory metabolism* (pp. 23-34). Springer Netherlands.

Kusaba, M., Tanaka, A., & Tanaka, R. (2013). Stay-green plants: what do they tell us about the molecular mechanism of leaf senescence?. *Photosynthesis research*, 117(1-3), 221-234.

---

## L

---

Lainé, P., Ourry, A., & Boucaud, J. (1995). Shoot control of nitrate uptake rates by roots of *Brassica napus* L.: effects of localized nitrate supply. *Planta*, 196(1), 77-83.

Lainé, P., Ourry, A., Macduff, J., Boucaud, J., & Salette, J. (1993). Kinetic parameters of nitrate uptake by different catch crop species: effects of low temperatures or previous nitrate starvation. *Physiologia plantarum*, 88(1), 85-92.

Lara, M. E. B., Garcia, M. C. G., Fatima, T., Ehneb, R., Lee, T. K., Proels, R., Tanner, W., Roitsch, T. (2004). Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *The Plant Cell*, 16(5), 1276-1287.

Lassaletta, L., Billen, G., Grizzetti, B., Anglade, J., & Garnier, J. (2014). 50 year trends in nitrogen use efficiency of world cropping systems: the relationship between yield and nitrogen input to cropland. *Environmental Research Letters*, 9(10), 105011.

Latef, A.A.A., Tran, L.S.P. (2016). Impacts of priming with silicon on the growth and tolerance of maize plants to alkaline stress. *Frontiers in plant science*, 7,243.

Ledgard, S. F., & Steele, K. W. (1992). Biological nitrogen fixation in mixed legume/grass pastures. *Plant and soil*, 141(1-2), 137-153.

Lee, I. C., Hong, S. W., Whang, S. S., Lim, P. O., Nam, H. G., & Koo, J. C. (2011). Age-dependent action of an ABA-inducible receptor kinase, RPK1, as a positive regulator of senescence in *Arabidopsis* leaves. *Plant and Cell physiology*, 52(4), 651-662.

Lee, S., Seo, P. J., Lee, H. J., & Park, C. M. (2012). A NAC transcription factor NTL4 promotes reactive oxygen species production during drought-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 70(5), 831-844.

Lejay, L., Gansel, X., Cerezo, M., Tillard, P., Müller, C., Krapp, A., ... & Gojon, A. (2003). Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase. *The Plant Cell*, 15(9), 2218-2232.

Leopold, A. C. (1975). Aging, senescence, and turnover in plants. *BioScience*, 25(10), 659-662.



- Li, J. R., Yu, K., Wei, J. R., Ma, Q., Wang, B. Q., & Yu, D. (2010). Gibberellin retards chlorophyll degradation during senescence of Paris polyphylla. *Biologia plantarum*, 54(2), 395-399.
- Liang, Y., Nikolic, M., Bélanger, R., Gong, H., Song, A. (2015). Silicon in Agriculture: From Theory to Practice. Springer.
- Liang, Y., Sun, W., Zhu, Y. G., & Christie, P. (2007). Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: a review. *Environmental pollution*, 147(2), 422-428.
- Lim, P. O., Kim, H. J., & Gil Nam, H. (2007). Leaf senescence. *Annu. Rev. Plant Biol*, 58, 115-136.
- Lim, P. O., Lee, I. C., Kim, J., Kim, H. J., Ryu, J. S., Woo, H. R., & Nam, H. G. (2010). Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. *Journal of experimental botany*, 61(5), 1419-1430.
- Lim, P. O., Woo, H. R., & Nam, H. G. (2003). Molecular genetics of leaf senescence in Arabidopsis. *Trends in plant science*, 8(6), 272-278.
- Liu, J., Zhang, H., Zhang, Y., & Chai, T. (2013). Silicon attenuates cadmium toxicity in Solanum nigrum L. by reducing cadmium uptake and oxidative stress. *Plant physiology and biochemistry*, 68, 1-7.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$  method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Lobell, D. B., Sibley, A., & Ortiz-Monasterio, J. I. (2012). Extreme heat effects on wheat senescence in India. *Nature Climate Change*, 2(3), 186.
- Lohman, K. N., Gan, S., John, M. C., & Amasino, R. M. (1994). Molecular analysis of natural leaf senescence in Arabidopsis thaliana [senescence associated genes]. *Physiologia Plantarum* (Denmark).
- Long, S. P., ZHU, X. G., Naidu, S. L., & Ort, D. R. (2006). Can improvement in photosynthesis increase crop yields?. *Plant, Cell & Environment*, 29(3), 315-330.
- Lu, Q., Wen, X., Lu, C., Zhang, Q., & Kuang, T. (2003). Photoinhibition and photoprotection in senescent leaves of field-grown wheat plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(8), 749-754.
- Lux, A., Luxová, M., Abe, J., Tanimoto, E., Hattori, T., & Inanaga, S. (2003). The dynamics of silicon deposition in the sorghum root endodermis. *New Phytologist*, 158(3), 437-441.

---

## M

---

- Ma, C. C., Li, Q. F., Gao, Y. B., & Xin, T. R. (2004). Effects of silicon application on drought resistance of cucumber plants. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50(5), 623-632.



Ma, J. F. (2004). Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50(1), 11-18.

Ma, J. F., & Takahashi, E. (2002). Soil, Fertilizer, and Plant Silicon Research in Japan. *Elsevier*, Amsterdam.

Ma, J. F., & Yamaji, N. (2006). Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends in plant science*, 11(8), 392-397.

Ma, J. F., & Yamaji, N. (2008). Functions and transport of silicon in plants. *Cellular and molecular life sciences*, 65(19), 3049-3057.

Ma, J. F., & Yamaji, N. (2015). A cooperative system of silicon transport in plants. *Trends in Plant Science*, 20(7), 435-442.

Ma, J. F., Miyake, Y., & Takahashi, E. (2001). Silicon as a beneficial element for crop plants. In *Studies in plant Science* (Vol. 8, pp. 17-39). Elsevier.

Ma, J. F., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., ... & Yano, M. (2006). A silicon transporter in rice. *Nature*, 440(7084), 688.

Ma, J. F., Yamaji, N., Mitani, N., Tamai, K., Konishi, S., Fujiwara, T., ... & Yano, M. (2007). An efflux transporter of silicon in rice. *Nature*, 448(7150), 209.

Mahdieh, M., Habibollahi, N., Amirjani, M. R., Abnosi, M. H., & Ghorbanpour, M. (2015). Exogenous silicon nutrition ameliorates salt-induced stress by improving growth and efficiency of PSII in *Oryza sativa* L. cultivars. *Journal of soil science and plant nutrition*, 15(4), 1050-1060.

Malagoli, P., Lainé, P., Le Deunff, E., Rossato, L., Ney, B., & Ourry, A. (2004). Modeling nitrogen uptake in oilseed rape cv Capitol during a growth cycle using influx kinetics of root nitrate transport systems and field experimental data. *Plant physiology*, 134(1), 388-400.

Malagoli, P., Lainé, P., Rossato, L., Ourry, A. (2005a). Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to harvest. II. An 15N-labellingbased simulation model of N partitioning between vegetative and reproductive tissues. *Annals of Botany*, 95, 1187-1198.

Malagoli, P., Lainé, P., Rossato, L., Ourry, A. (2005b). Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to harvest: I. Global N flows between vegetative and reproductive tissues in relation to leaf fall and their residual N. *Annals of Botany*, 95, 853-861.



Mali, M., & Aery, A. N. C. (2008). Silicon effects on nodule growth, dry-matter production, and mineral nutrition of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 171(6), 835-840.

Manivannan, A., Soundararajan, P., Jeong, B.R. (2017). Silicon-mediated modulations of genes and secondary metabolites in plants, a comprehensive overview. In *Silicon in plants : Advances and future prospects*. Taylor and Francis group.

Manivannan, A., Soundararajan, P., Jeong, B.R. (2017). Silicon-mediated modulations of genes and secondary metabolites in plants, a comprehensive overview. In *Silicon in plants: Advances and future prospects*, Taylor and Francis group: pp153-174

Markovich, O., Steiner, E., Kouřil, Š., Tarkowski, P., Aharoni, A., & Elbaum, R. (2017). Silicon promotes cytokinin biosynthesis and delays senescence in Arabidopsis and Sorghum. *Plant, cell & environment*, 40(7), 1189-1196.

Marouf, A., & Reynaud, J. (2007). *La botanique de A à Z*. Paris, France.

Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., & Suzuki, A. (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of botany*, 105(7), 1141-1157.

Masferrer, A., Arró, M., Manzano, D., Schaller, H., Fernández-Busquets, X., Moncaleán, P., ... & Ferrer, A. (2002). Overexpression of *Arabidopsis thaliana* farnesyl diphosphate synthase (FPS1S) in transgenic Arabidopsis induces a cell death/senescence-like response and reduced cytokinin levels. *The Plant Journal*, 30(2), 123-132.

Matoh, T., Murata, S., & Takahashi, E. (1991). Effect of silicate application on photosynthesis of rice [*Oryza sativa*] plants. *Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition (Japan)*.

McCarthy, D. J., Chen, Y., & Smyth, G. K. (2012). Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic acids research*, 40(10), 4288-4297.

McDowell, L.R. (2003): Minerals in Animal And Human Nutrition. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier Science. 2, 660.

Meharg, C., & Meharg, A. A. (2015). Silicon, the silver bullet for mitigating biotic and abiotic stress, and improving grain quality, in rice? *Environmental and Experimental Botany*, 120, 8-17.

Meunier, J. D. (2003). Le rôle des plantes dans le transfert du silicium à la surface des continents. *Comptes Rendus Geoscience*, 335(16), 1199-1206.





Meunier, J. D., Barboni, D., Anwar-ul-Haq, M., Levard, C., Chaurand, P., Vidal, V., ... & Keller, C. (2017). Effect of phytoliths for mitigating water stress in durum wheat. *New Phytologist*, 215(1), 229-239.

Meyer, J.H., Keeping, M.G. (2001). Past, present and future research of the role of silicon for sugarcane in southern Africa. *Studies in plant science*, 8,257-275

Miao, B. H., Han, X. G., & Zhang, W. H. (2010). The ameliorative effect of silicon on soybean seedlings grown in potassium-deficient medium. *Annals of Botany*, 105(6), 967-973.

Miao, Y., Laun, T., Zimmermann, P., & Zentgraf, U. (2004). Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in Arabidopsis. *Plant molecular biology*, 55(6), 853-867.

Mitani, N., & Ma, J. F. (2005). Uptake system of silicon in different plant species. *Journal of Experimental Botany*, 56(414), 1255-1261.

Mitani, N., Chiba, Y., Yamaji, N. & Ma, J.F. (2009a). Identification and Characterization of Maize and Barley Lsi2-Like Silicon Efflux Transporters Reveals a Distinct Silicon Uptake System from That in Rice. *The Plant Cell*, 21(7), 2133-2142.

Mitani, N., Yamaji, N. & Ma, J.F. (2007). Characterization of substrate specificity of a rice silicon transporter, Lsi1. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 456(4), 679-686.

Mitani, N., Yamaji, N., & Ma, J. F. (2009b). Identification of Maize Silicon Influx Transporters. *Plant and Cell Physiology*, 50(1), 5-12.

Mitani, N., Yamaji, N., Ago, Y., Iwasaki, K., & Ma, J. F. (2011). Isolation and functional characterization of an influx silicon transporter in two pumpkin cultivars contrasting in silicon accumulation. *The Plant Journal*, 66(2), 231-240.

Mitani-Ueno, N., Yamaji, N., Zhao, F. J., & Ma, J. F. (2011). The aromatic/arginine selectivity filter of NIP aquaporins plays a critical role in substrate selectivity for silicon, boron, and arsenic. *Journal of experimental botany*, 62(12), 4391-4398.

Miyake, Y., & Takahashi, E. (1978). Silicon deficiency of tomato plant. *Soil science and plant nutrition*, 24(2), 175-189.

Morot-Gaudry, J. F., Orsel, M., Diaz, C., Daniel-Vedele, F., & Masclaux-Daubresse, C. (2006). Absorption et assimilation du nitrate et recyclage de l'azote organique chez les plantes: intérêt pour le colza. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 13(6), 393-402.

Morot-Gaudry, J. F., Prat, R., Bohn-Courseau, I., Jullien, M., Parcy, F., Perrot-Rechenmann, C., ... & Richard, L. (2017). *Biologie végétale: Croissance et développement-3e éd.* Dunod.



Morris, K., Mackerness, S. A. H., Page, T., John, C. F., Murphy, A. M., Carr, J. P., & Buchanan-Wollaston, V. (2000). Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *The Plant Journal*, 23(5), 677-685.

Motomura, H., Fujii, T., & Suzuki, M. (2000). Distribution of silicified cells in the leaf blades of *Pleioblastus chino* (Franchet et Savatier) Makino (Bambusoideae). *Annals of Botany*, 85(6), 751-757.

---

## N

---

Nagaharu, U. (1935). Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Journal of Japanese Botany*, 7(7), 389-452.

Navabpour, S., Morris, K., Allen, R., Harrison, E., A-H-Mackerness, S., & Buchanan-Wollaston, V. (2003). Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, 54(391), 2285-2292.

Nayar, P. K., Misra, A. K., & Patnaik, S. (1975). Rapid microdetermination of silicon in rice plant. *Plant and Soil*, 42(2), 491-494.

Nelwamondo, A., & Dakora, F. D. (1999). Silicon promotes nodule formation and nodule function in symbiotic cowpea (*Vigna unguiculata*). *The New Phytologist*, 142(3), 463-467.

Nesi, N., Delourme, R., Brégeon, M., Falentin, C., & Renard, M. (2008). Genetic and molecular approaches to improve nutritional value of *Brassica napus* L. seed. *Comptes rendus biologies*, 331(10), 763-771.

Nhan, P. P., Hai, N. T. (2013): Amelioration of aluminum toxicity on OM4900 rice seedlings by sodium silicate. *African Journal of Plant Science*, 7, 208-212.

Nicot, N., Hausman, J.F., Hoffmann, L., Evers, D. (2005). Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of experimental botany*, 56, 2907-2914.

Noh, Y. S., & Amasino, R. M. (1999). Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of *SAG12*. *Plant molecular biology*, 41(2), 181-194.

---

## O

---

Ono, K., Terashima, I., & Watanabe, A. (1996). Interaction between nitrogen deficit of a plant and nitrogen content in the old leaves. *Plant and cell physiology*, 37(8), 1083-1089.



---

**P**


---

Panavas, T., Walker, E. L., & Rubinstein, B. (1998). Possible involvement of abscisic acid in senescence of daylily petals. *Journal of Experimental Botany*, 49(329), 1987-1997.

Pandey, S., Gupta, K., & Mukherjee, A. K. (2007). Impact of cadmium and lead on *Catharanthus roseus*-A phytoremediation study. *Journal of Environmental Biology*, 28(3), 655.

Papas, A., Ingalls, J.R., Campbell, L.D. (1979). Studies on the effects of rapeseed meal on thyroid status of cattle, glucosinolate and iodine content of milk and other parameters. *The journal of nutrition*, 109(7), 1129-1139.

Parrott, D., Yang, L., Shama, L., & Fischer, A. M. (2005). Senescence is accelerated, and several proteases are induced by carbon "feast" conditions in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Planta*, 222(6), 989-1000.

Paynel, F., Murray, P. J., & Cliquet, J. B. (2001). Root exudates: a pathway for short-term N transfer from clover and ryegrass. *Plant and soil*, 229(2), 235-243.

Peoples M.B., Dalling M.J. (1988). The interplay between proteolysis and amino acids metabolism during senescence and nitrogen reallocation. In: Noodén L.D., Leopold A.C., eds. Senescence and aging in plants. *San Diego: Academic Press*, 181-217.

Pommerrenig, B., Diehn, T. A., & Bienert, G. P. (2015). Metalloido-porins: Essentiality of Nodulin 26-like intrinsic proteins in metalloid transport. *Plant Science*, 238, 212-227.

Pontigo S, Ribera A, Gianfreda L, de la Luz Mora M, Nikolic M, Cartes P (2015) Silicon in vascular plants: uptake, transport and its influence on mineral stress under acidic conditions. *Planta*, 242 (1) : 23-37

---

**Q**


---

Qin, T., Fu, J., Zhang, N., & Du, L. (2006). Comparative studies of senescence-related enzymes in the cotyledon of chlorophyll b-deficient mutant and its wild type oilseed rape during senescence. *Plant science*, 171(3), 293-299.

Quirino, B. F., Noh, Y. S., Himelblau, E., & Amasino, R. M. (2000). Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in plant science*, 5(7), 278-282.

---

**R**


---

Rains, D. W., Epstein, E., Zasoski, R. J., & Aslam, M. (2006). Active silicon uptake by wheat. *Plant and Soil*, 280(1-2), 223-228.



- Rasoolizadeh, A., Labbe, C., Sonah, H., Deshmukh, R., Belzile, F., Bélanger, R.R. (2018). RNA-seq analysis of the role of silicon in the soybean-*Phytophthora sojae* interaction reveals interference with effector-receptor expression. *BMC Plant Biology* 18: 97.
- Rathke, G. W., Christen, O., & Diepenbrock, W. (2005). Effects of nitrogen source and rate on productivity and quality of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) grown in different crop rotations. *Field crops research*, 94(2-3), 103-113.
- Raven, J. A. (2001). Silicon transport at the cell and tissue level. *In Studies in plant science* (Vol. 8, pp. 41-55). Elsevier.
- Raven, J. A. (2003). Cycling silicon—the role of accumulation in plants. *New Phytologist*, 158(3), 419-421.
- Ray, S., Mondal, W.A., Choudhuri, M.A. (1983). Regulation of leaf senescence, grain filling and yield of rice by kinetin and acid abscissic. *Physiologia Plantarum*. 59,343-346
- Reviron, M. P., Vartanian, N., Sallantin, M., Huet, J. C., Pernollet, J. C., & de Vienne, D. (1992). Characterization of a novel protein induced by progressive or rapid drought and salinity in *Brassica napus* leaves. *Plant Physiology*, 100(3), 1486-1493.
- Richards, R. A. (2000). Selectable traits to increase crop photosynthesis and yield of grain crops. *Journal of experimental botany*, 51(suppl\_1), 447-458.
- Rigaiil, G., Balzergue, S., Brunaud, V., Blondet, E., Rau, A., Rogier, O., ... & Lurin, C. (2016). Synthetic data sets for the identification of key ingredients for RNA-seq differential analysis. *Briefings in bioinformatics*, 19(1), 65-76.
- Rizwan, M., Meunier, J. D., Davidian, J. C., Pokrovsky, O. S., Bovet, N., & Keller, C. (2016). Silicon alleviates Cd stress of wheat seedlings (*Triticum turgidum* L. cv. Claudio) grown in hydroponics. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(2), 1414-1427.
- Rodrigues, F.Á., Benhamou, N., Datnoff, L.E., Jones, J.B., Bélanger, R.R. (2003). Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon-mediated rice blast resistance. *Phytopathology*, 93, 535-46.
- Rodrigues, F.A., Resende, R.S., Dallagnol, L.J., Datnoff, L.E. (2015). Silicon potentiates host defense mechanisms against infection by plant pathogens. *In silicon and plant diseases*, ed. Rodrigues, FA, Datnoff LE (Springer), 109-138.
- Rolland, F., Moore, B., & Sheen, J. (2002). Sugar sensing and signaling in plants. *The plant cell*, 14(suppl 1), S185-S205.





Rossato, L., Laine, P., & Ourry, A. (2001). Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. *Journal of Experimental Botany*, 52(361), 1655-1663.

Rossato, L., MacDuff, J.H., Laîné, P., Le Deunff, E., & Ourry, A. (2002). Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: effects of methyl jasmonate on nitrate uptake, senescence, growth, and VSP accumulation. *Journal of Experimental Botany*, 53 (371), 1131-1141.

Ruiz-Espinoza, F.H., Murillo-Amador, B., García-Hernández, J.L., Fenech-Larios, L., Rueda-Puente, E.O., Troyo-Diéguez, E., *et al.* (2010). Field evaluation of the relationship between chlorophyll content in basil leaves and portable chlorophyll meter (SPAD-502) readings. *Journal of Plant Nutrition*, 33,423-438.

---

## S

---

Safavi-Rizi, V., Franzaring, J., Fangmeier, A., & Kunze, R. (2018). Divergent N deficiency-dependent senescence and transcriptome response in developmentally old and young *Brassica napus* leaves. *Frontiers in plant science*, 9, 48.

Saito, K., Yamamoto, A., Sa, T., & Saigusa, M. (2005). Rapid, Micro-Methods to Estimate Plant Silicon Content by Dilute Hydrofluoric Acid Extraction and Spectrometric Molybdenum Method: I. Silicon in Rice Plants and Molybdenum Yellow Method. *Soil Science & Plant Nutrition*, 51(1), 29-36.

Sakakibara, H., Takei, K., Hirose, N. (2006). Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. *Trends in Plants Science*, 11,440-448.

Samuels, A., Glass, A.D.M., Ehret, D.L., Menzies, J.G. (1991). Mobility and deposition of silicon in cucumber plants. *Plant, Cell and Environment*, 14,485-492.

Sarwat, M., Naqvi, A. R., Ahmad, P., Ashraf, M., & Akram, N. A. (2013). Phytohormones and microRNAs as sensors and regulators of leaf senescence: assigning macro roles to small molecules. *Biotechnology advances*, 31(8), 1153-1171.

Savant, N.K., Snyder, G.H., Datnoff, L.E. (1997). Silicon management and sustainable rice production. *Advances in agronomy*. 58,151-199.

Schippers, J. H., Jing, H. C., Hille, J., & Dijkwel, P. P. (2007). Developmental and hormonal control of leaf senescence. *Senescence processes in plants*, 145-170.

Schmidt, R.E., Zhang, X., Chalmeurs, D.R. (1999). Response of photosynthesis and superoxide dismutase to silica apply to creeping bentgrass grown under to fertility levels. *Journal of Plant Nutrition*, 22, 1763-1773.



- Schulte auf'm Erley, G., Wijaya, K. A., Ulas, A., Becker, H., Wiesler, F., & Horst, W. J. (2007). Leaf senescence and N uptake parameters as selection traits for nitrogen efficiency of oilseed rape cultivars. *Physiologia Plantarum*, 130(4), 519-531.
- Seltmann, M. A., Stingl, N. E., Lautenschlaeger, J. K., Krischke, M., Mueller, M. J., & Berger, S. (2010). Differential impact of lipoxygenase 2 and jasmonates on natural and stress-induced senescence in Arabidopsis. *Plant physiology*, 152(4), 1940-1950.
- Sexton, R., & Roberts, J. A. (1982). Cell biology of abscission. *Annual Review of Plant Physiology*, 33(1), 133-162.
- Shahri, W. (2011). Senescence: concepts and synonyms. *Asian Journal of Plant Sciences*, 10(1), 24.
- Shan, X., Wang, J., Chua, L., Jiang, D., Peng, W., & Xie, D. (2011). The role of Arabidopsis Rubisco activase in jasmonate-induced leaf senescence. *Plant physiology*, 155(2), 751-764.
- Shi, G.R., Cai, Q.S., Liu, C.F., Wu, L. (2010). Silicon alleviates cadmium toxicity in peanut plants in relation to cadmium distribution and stimulation of antioxidative enzymes. *Plant Growth Regul*, 61:45–52.
- Slimane, R. B. (2010). Effets de la septoriose foliaire sur la senescence et les flux d'azote pendant le remplissage des grains chez le blé tendre (Doctoral dissertation, AgroParisTech).
- Smart, C. M., Scofield, S. R., Bevan, M. W., & Dyer, T. A. (1991). Delayed leaf senescence in tobacco plants transformed with tmr, a gene for cytokinin production in *Agrobacterium*. *The Plant Cell*, 3(7), 647-656.
- Smith, F.W. (1982). Mineral Nutrition of Legumes. In: Vincent JM, ed. *Nitrogen fixation in legumes*. Sydney, Australia: Academic Press, 155±172.
- Snowden, K. C., Simkin, A. J., Janssen, B. J., Templeton, K. R., Loucas, H. M., Simons, J. L., ... & Klee, H. J. (2005). The Decreased apical dominance1/Petunia hybrida carotenoid cleavage dioxygenase8 gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development. *The Plant Cell*, 17(3), 746-759.
- Solomon, M. B., Lynch, G. P., Paroczay, E., & Norton, S. (1991). Influence of rapeseed meal, whole rapeseed, and soybean meal on fatty acid composition and cholesterol content of muscle and adipose tissue from ram lambs. *Journal of Animal Science*, 69(10), 4055-4061.
- Sommer, M., Kaczorek, D., Kuzyakov, Y., & Breuer, J. (2006). Silicon pools and fluxes in soils and landscapes—a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 169(3), 310-329.



Sonobe, K., Hattori, T., An, P., Tsuji, W., Eneji, A. E., Kobayashi, S., ... & Inanaga, S. (2010). Effect of silicon application on sorghum root responses to water stress. *Journal of plant nutrition*, 34(1), 71-82.

Sorin, C. (2014). Subcellular modification and nutrient remobilization during *Brassica napus* leaf senescence: effects of abiotic stresses (Doctoral dissertation, université de Rennes 1).

---

## T

---

Takahashi, E., Ma, J. F., & Miyake, Y. (1990). The possibility of silicon as an essential element for higher plants. *Comments on Agricultural and Food Chemistry*, 2(2), 99-102.

Tavakkoli, E., English, P., & Guppy, C. N. (2011). Interaction of silicon and phosphorus mitigate manganese toxicity in rice in a highly weathered soil. *Communications in soil science and plant analysis*, 42(5), 503-513.

Thomas, H., & Stoddart, J. L. (1980). Leaf senescence. *Annual review of plant physiology*, 31(1), 83-111.

Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R., & Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418(6898), 671.

Tilsner, J., Kassner, N., Struck, C., & Lohaus, G. (2005). Amino acid contents and transport in oilseed rape (*Brassica napus* L.) under different nitrogen conditions. *Planta*, 221(3), 328-338.

Tottey, S., Block, M.A., Allen, M., Westergren, T., Albrieux, C., Scheller, H.V., Merchant, S., Jensen, P.E. (2003): Arabidopsis CHL27, located in both envelope and thylakoid membranes, is required for the synthesis of protochlorophyllide. *Proceedings of National. Academy of Sciences USA*, 100, 16119-16124.

Tripathi, D. K., Singh, V. P., Prasad, S. M., Chauhan, D. K., Dubey, N. K., & Rai, A. K. (2015). Silicon-mediated alleviation of Cr (VI) toxicity in wheat seedlings as evidenced by chlorophyll florescence, laser induced breakdown spectroscopy and anatomical changes. *Ecotoxicology and environmental safety*, 113, 133-144.

Tripathi, D.K., Singh, V.P., Kumar, D., Chauhan, D.K. (2012). Rice seedlings under cadmium stress: effect of silicon on growth, cadmium uptake, oxidative stress, antioxidant capacity and root and leaf structures. *Chem Ecol*, 28:281–91.

Tuna, A.L., Kaya, C., Higgs, D., Murillo-Amador, B., Aydemir, S., Girgin, A.R. (2008). Silicon improves salinity tolerance in wheat plants. *Environmental and Experimental Botany*, 62,10-16.



---

 V
 

---

Van Bockhaven, J., Spíchal, L., Novák, O., Strnad, M., Asano, T., Kikuchi, S., *et al.* (2015). Silicon induces resistance to the brown spot fungus *Cochliobolus miyabeanus* by preventing the pathogen from hijacking the rice ethylene pathway. *New Phytologist*, 206,761–773.

Van der Graaff, E., Schwacke, R., Schneider, A., Desimone, M., Flügge, U. I., & Kunze, R. (2006). Transcription analysis of Arabidopsis membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiology*, 141(2), 776-792.

Vivancos, J., Labbé, C., Menzies, J.G., Bélanger, R.R. (2015). Silicon-mediated resistance of Arabidopsis against powdery mildew involves mechanisms other than the salicylic acid (SA)-dependent defence pathway. *Molecular Plant Pathology* 16: 572-582.

---

 W
 

---

Wallace, I.S. & Roberts, D.M. (2005). Distinct transport selectivity of two structural subclasses of the nodulin-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporin channels. *Biochemistry*, 44, 16826–16834.

Wang, M., Gao, L., Dong, S., Sun, Y., Shen, Q., Guo, S. (2017). Role of Silicon on Plant-Pathogen Interactions. *Frontiers in Plant Science*, 8, 701.

Wang, R., Xing, X., Wang, Y., Tran, A., & Crawford, N.M. (2009). A Genetic Screen for Nitrate Regulatory Mutants Captures the Nitrate Transporter Gene *NRT1.1*. *Plant Physiology*, 151(1).

Watanabe, M., Balazadeh, S., Tohge, T., Erban, A., Giavalisco, P., Kopka, J., Mueller-Roeber, B., Fernie, A.R., & Hoefgen, R. (2013). Comprehensive dissection of spatiotemporal metabolic shifts in primary, secondary, and lipid metabolism during developmental senescence in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 162(3), 1290-1310.

Weaver, L. M., & Amasino, R. M. (2001). Senescence is induced in individually darkened Arabidopsis leaves, but inhibited in whole darkened plants. *Plant Physiology*, 127(3), 876-886.

Weaver, L. M., Gan, S., Quirino, B., & Amasino, R. M. (1998). A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant molecular biology*, 37(3), 455-469.

Wingler, A., Masclaux-Daubresse, C., & Fischer, A. M. (2009). Sugars, senescence, and ageing in plants and heterotrophic organisms. *Journal of experimental botany*, 60(4), 1063-1066.

Wingler, A., Purdy, S., MacLean, J. A., & Pourtau, N. (2005). The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *Journal of experimental botany*, 57(2), 391-399.





Wingler, A., von Schaewen, A., Leegood, R. C., Lea, P. J., & Quick, W. P. (1998). Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light: effects on NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. *Plant Physiology*, 116(1), 329-335.

Wojciechowska, N., Sobieszczuk-Nowicka, E., & Bagniewska-Zadworna, A. (2018). Plant organ senescence—regulation by manifold pathways. *Plant Biology*, 20(2), 167-181.

Wong, Y. C., Heits, A., & Ville, J. D. (1972). Foliar symptoms of silicon deficiency in the sugarcane plant. *Proc Cong Int Soc Sugarcane Technol*, 14, 766-776.

Wu, B., & Beitz, E. (2007). Aquaporins with selectivity for unconventional permeants. *Cellular and molecular life sciences*, 64(18), 2413-2421.

Wu, X. Y., Kuai, B. K., Jia, J. Z., & Jing, H. C. (2012). Regulation of leaf senescence and crop genetic improvement. *Journal of integrative plant biology*, 54(12), 936-952.

---

## X

---

Xu, G., Fan, X., & Miller, A. J. (2012). Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual review of plant biology*, 63, 153-182.

---

## Y

---

Yamaji, N., Chiba, Y., Mitani-Ueno, N., & Ma, J. F. (2012). Functional characterization of a silicon transporter gene implicated in silicon distribution in barley. *Plant physiology*, 160(3), 1491-1497.

Yamaji, N., Mitatni, N., & Ma, J. F. (2008). A transporter regulating silicon distribution in rice shoots. *The Plant Cell*, 20(5), 1381-1389.

Yip, R., Dallman, P.R. (1996): Iron. In: Ziegler EE, Filer LJ, editors. Present knowledge in nutrition. 7th ed. Washington DC: ILSI Press; pp. 278–92.

Yoshida, S. (1965). Chemical aspects of the role of silicon in physiology of the rice plant. *Bull. nat. Inst. agric. Sci., Japan, Ser. B*, (15), 1-58.

Yu, C. W., Murphy, T. M., & Lin, C. H. (2003). Hydrogen peroxide-induced chilling tolerance in mung beans mediated through ABA-independent glutathione accumulation. *Functional Plant Biology*, 30(9), 955-963.

Yu, K., Wang, Y., Wei, J., Ma, Q., Yu, D., & Li, J. (2009). Improving rhizome yield and quality of Paris polyphylla through gibberellic acid-induced retardation of senescence of aerial parts. *Plant signaling & behavior*, 4(5), 413-415.



---

**Z**

---

Zanão Júnior, L. A., Fontes, R. L. F., Neves, J. C. L., Korndörfer, G. H., & Ávila, V. T. D. (2010). Rice grown in nutrient solution with doses of manganese and silicon. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34(5), 1629-1639.

Zhang, C., Wang, L., Zhang, W., Zhang, F. (2013a). Do lignification and silicification of the cell wall precede silicon deposition in the silica cell of the rice (*Oryza sativa* L.) leaf epidermis? *Plant Soil*, 372 137-149.

Zhang, H., & Zhou, C. (2013). Signal transduction in leaf senescence. *Plant molecular biology*, 82(6), 539-545.

Zhang, K., Xia, X., Zhang, Y., & Gan, S. S. (2012). An ABA-regulated and Golgi-localized protein phosphatase controls water loss during leaf senescence in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 69(4), 667-678.

Zhang, S., Li, S., Ding, X., Li, F., Liu, C., Liao, X., & Wang, R. (2013b). Silicon mediated the detoxification of Cr on pakchoi (*Brassica chinensis* L.) in Cr-contaminated soil. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 11(2), 814-819.

Zhao, X. Q., Mitani, N., Yamaji, N., Shen, R. F., & Ma, J. F. (2010). Involvement of silicon influx transporter OsNIP2; 1 in selenite uptake in rice. *Plant Physiology*, 153(4), 1871-1877.

Zhu, Y., & Gong, H. (2014). Beneficial effects of silicon on salt and drought tolerance in plants. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(2), 455-472.

Zimmermann, P. E. T. R. A., & Zentgraf, U. L. R. I. K. E. (2005). The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 10(3), 515.



# Annexes



# Annexes



# Effect of silicon on foliar senescence and nitrogen remobilization in *Brassica napus* L.



HADDAD C<sup>1</sup>, ARKOUN M<sup>2</sup>, YVIN JC<sup>2</sup>, ETIENNE P\*<sup>1</sup>, LAINE P\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutrition N,C,S (EVA) - 14032 Caen-France

<sup>2</sup>Centre Mondial de l'innovation – Centre de Recherche en Agro-Sciences. 27 avenue Franklin Roosevelt, F-35408 Saint-Malo, France

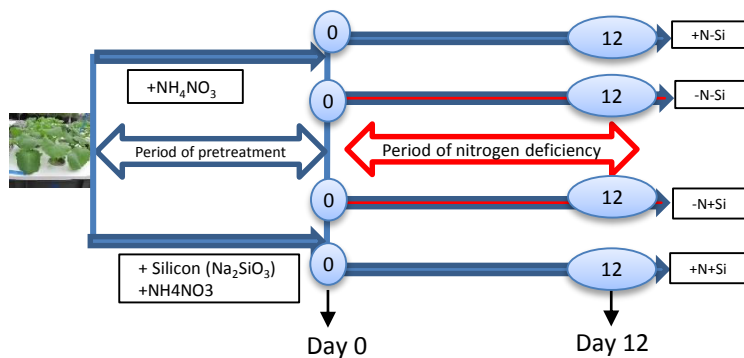
\*PhD supervisors

## INTRODUCTION

*Brassica napus* L. is an oleaginous crop requiring high nitrogen (N) inputs (140-200 Kg N ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup>). Nevertheless, oilseed rape is characterized by a poor nitrogen remobilization due to a drop of leaves with high nitrogen contents (2-2.5%; [1]). Previous studies suggest that a delay of leaf senescence process may increase the leaf life span which allow a better N remobilization especially during abiotic stress.

## OBJECTIVE

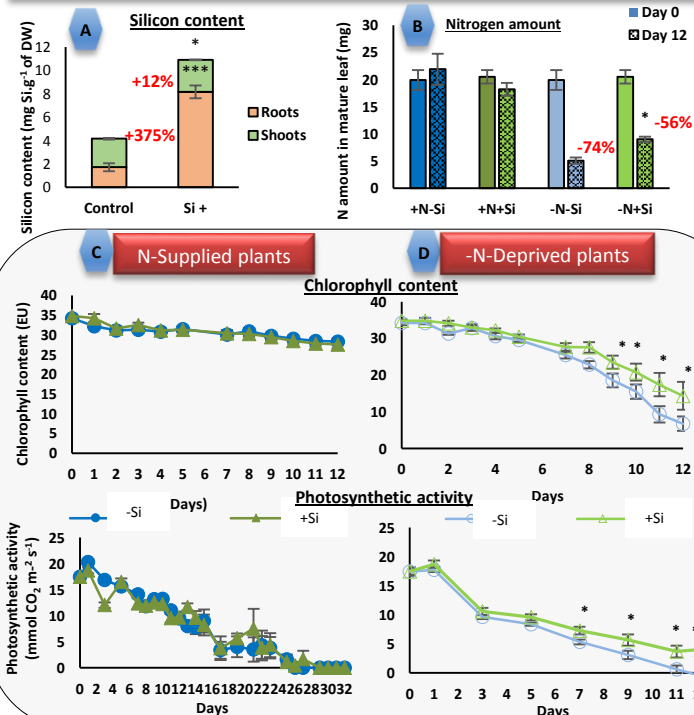
Silicon (Si) is known as a beneficial element for plants especially to protect them against biotic and abiotic stress such as N deficiency. In this context, the aim of our experiment was to study **the effect of Si supply on vegetative growth and remobilization of nitrogen associated with leaf senescence** of oilseed rape grown with or without nitrogen.



## MATERIALS AND METHODS

After germination on perlite, seedlings were transplanted into a plastic tank (20L) containing nutrient solution, after one week, plants were separated into two batches: the first is treated with Si (+Si: 1.7 mM Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>) and the second is not treated with silicon (-Si: Control). After one week of Si pretreatment, plants were grown during 12 days with (+N-Si; +N+Si) or without nitrogen (-N-Si; -N+Si). Then, they were harvested for measurements of growth, nitrogen management, chlorophyll content and photosynthetic activity.

## RESULTS



- ✓ Silicon (Si) is taken up by *Brassica napus* L and stored mainly in roots (A).
- ✓ Whatever N supply (+N or -N), Si has no effect on **growth** of rapeseed (data not shown).
- ✓ In N-deprived plants, **nitrogen** amount in mature leaf is higher in plant treated with Si than without Si (B).
- ✓ In +N+Si plants, Si has no effect on **chlorophyll content** or **photosynthetic activity** (C).
- ✓ In contrast, in -N+Si plants, Si supply reduced the degradation of **chlorophyll** and induced **a delay of leaf senescence** (D).

## CONCLUSION

These results indicate that **silicon** taken up by rapeseed **promotes a delay of senescence** induce by N deficiency and may improve N remobilization by increase leaf life span.

---

**Annexe 1: Acte de congrès rédigé pour les « 20<sup>ème</sup> journées de l'école doctorale (EdNBISE) », du 16 et 17 mars 2017 au Havre, France (Présentation d'un poster)**

---

**Effect of silicon on foliar senescence and nitrogen remobilization in *Brassica napus*.L**

HADDAD C<sup>1</sup>, ARKOUN M<sup>2</sup>, YVIN JC<sup>2</sup>, ETIENNE P\*<sup>1</sup>, LAINE P\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutrition N,C,S (EVA) - 14032 Caen-France

<sup>2</sup>Centre Mondial de l'innovation – Centre de Recherche en Agro-Sciences. 27 avenue Franklin Roosevelt, F-35408 Saint-Malo, France

\*PhD supervisors

**Abstract**

*Brassica napus*.L is an oleaginous crop requiring high nitrogen (N) inputs. Consequently, in despite of an increase of endogenous N remobilization from oldest leaves to young leaves associated with an acceleration of leaf senescence.

Silicon (Si) is known as a beneficial element for plants especially to protect them against stress. The aim of this work was to study the effect of Si on growth and management of N of oilseed rape. Plants were grown in a hydroponic culture, after two weeks of pre-culture, plants were separated into two batches: the first is treated with Si (1.7 mM and 1mM of 15NH<sub>4</sub> <sup>15</sup>NO<sub>3</sub>) and the second is not treated with Si. After one week of pretreatment, plants were grown during 21 days with (1mM of 14NH<sub>4</sub> 14NO<sub>3</sub>: +N-Si; +N-Si) or without N (-N-Si; -N+Si). The effects of Si-pretreatment on growth and N-management in oilseed rape were investigated. Analysis of Si content in Si-pretreated plants reveals that Si is absorbed by plant. After one week of pretreatment, silicon contents were 6.31 and 0.05 mg.g<sup>-1</sup> of DW in plants treated with or without Si, respectively.

In N supplied-plants (+N), Si has no effect on growth and N management. In contrast, in N deprived plants (-N), mature leaf from plants Si-pretreated (-N+Si) shown a higher leaf chlorophyll than mature from untreated plant (-N-Si). This result suggest that Si-pretreatment allow to maintain leaf chlorophyll contents in leaves of N deprived plants. In the same time, during 21 days of N-deficiency, Si-pretreated plants (-N+Si) have a higher photosynthetic activity than control plants (-N-Si). Finally, using 15N, this study has shown a delay of N remobilization in -N+Si plants compared to control (-N-Si). These results shown that a Si-pretreatment induces metabolic process which protect plant against stress (N-deprivation). However, cellular mechanisms behind in these benefit effect remain poorly understood especially in oilseed rape.

**Keywords:** plant physiology, nitrogen metabolism, *Brassica napus*.L, leaf senescence

# Effect of silicon on growth and nitrogen nutrition of *Brassica napus* L.

HADDAD C<sup>1</sup>, ARKOUN M<sup>2</sup>, YVIN JC<sup>2</sup>, ETIENNE P\*<sup>1</sup>, LAINE P\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutrition N,C,S (EVA) - 14032 Caen-France . \*PhD supervisors

<sup>2</sup>Centre Mondial de l'Innovation – Centre de Recherche en Agro-Sciences. 18 avenue Franklin Roosevelt, BP80139 35401 Saint-Malo, France

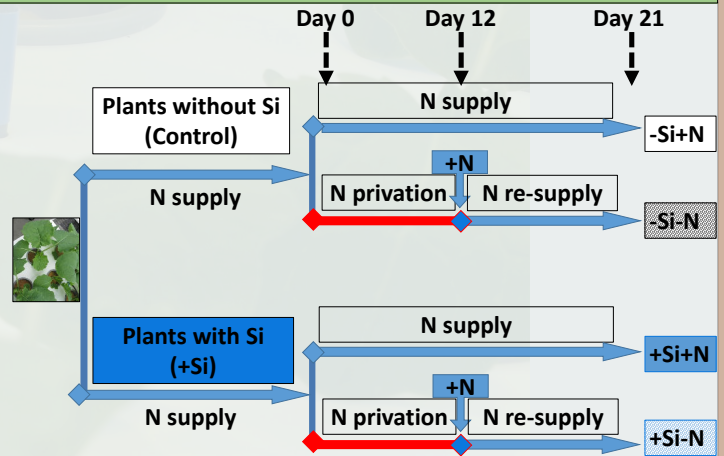
Cylia.haddad@unicaen.fr

## 1. Context and objective

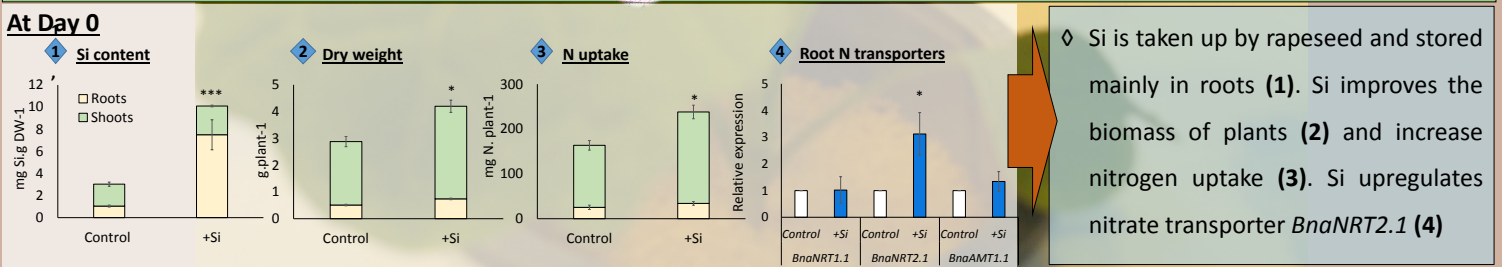
*Brassica napus* L. is an important agricultural crop that requires a large amount of nitrogen (N: 140-200 Kg ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup>) to maintain yield and the quality of harvest product. Nevertheless, this crop is characterized by a low N Use Efficiency (NUE). Indeed, only 50 % of the N input is recovered in the seeds, while a significant proportion of N returns to the soil via leaf fall with high N contents (2-3%), leading to environmental pollutions by nitrate leaching and/or the production of greenhouse gases such as nitrous oxide. To improve the agro-environmental balance of rape, the aim of our experiment is to study the effect of silicon (Si) supply, which is known as a beneficial element for plants especially to protect them against biotic and abiotic stress (e.g. nutritional deficiency), on growth and nitrogen uptake of oilseed rape plants grown with or without nitrogen.

## 2. Materials and methods

After germination on perlite, oilseed rape seedlings were transplanted for one week into a plastic tank containing a nutrient solution. Plants were then separated into two batches: the first is supplied with Si (+Si: 1.7mM) while the second is not treated with silicon (Control). After one week of Si pretreatment, plants were separated into four batches and grown during 12 days with (-Si+N; +Si+N) or without (-Si-N; +Si-N) nitrogen. After this period, plants that were deficient in nitrogen have been supplied with nitrogen for 9 days (D21). At days 0, 12 and 21, plants were harvested for measurements of growth and nitrogen management.

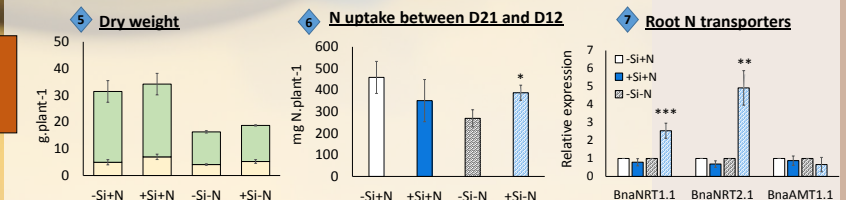


## 3. Results



- ◆ A silicon pretreatment has no effect on the growth (5).
- ◆ Si pretreatment lead to a better N uptake after a period of N deficiency (6) and upregulates the nitrate transporters *BnaNRT1.1* and *BnaNRT2.1* (7)

### At Day 21



## Conclusion

- Our results indicate that after one week of Si treatment, plants supplied with N (+Si ; day 0) show a higher expression of genes encoding root nitrate transporter *BnaNRT2.1* and a higher root N uptake comparatively to -Si plants, leading to an improvement of growth.
- After a period of N deficiency (from day 0 to day 12), plants pretreated with silicon (+Si-N) and then resupplied with N (from day 12 to day 21) show an increase of the expression of genes encoding root nitrate transporters *BnaNRT1.1* and *BnaNRT2.1* and of the root nitrogen uptake, comparatively to control plants (-Si-N).

---

**Annexe 2: Acte de congrès rédigé pour les «Journées SFR Normandie Végétale », du 12 et 13 juillet 2017 à Rouen, France (Présentation d'un poster)**

---

**Effect of silicon on growth and nitrogen nutrition of *Brassica napus* L.**

HADDAD C<sup>1</sup>, ARKOUN M<sup>2</sup>, YVIN JC<sup>2</sup>, ETIENNE P<sup>\*1</sup>, LAINE P<sup>\*1</sup>

**Adresses of institutions:**

<sup>1</sup>Normandie Université, Caen, France,

<sup>2</sup>UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutriments N, C, S, UNICAEN, Caen, France,

<sup>3</sup>UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutriments N, C, S, INRA, Caen, France

<sup>4</sup>Centre Mondial d'Innovation, Groupe Roullier, Saint Malo, France

\*Authors with equal contribution

**Abstract**

*Brassica napus*.L is an oleaginous crop requiring high nitrogen (N) inputs, but only 50% of N supplied in form of fertilizer is found in rapeseed, the rest of N can be loosed by leaching and provoke environmental pollutions. Silicon (Si) is known as a beneficial element for plants especially to protect them against stress. The aim of this work was to study the effect of Si on growth and management of N of oilseed rape.

Plants were grown in a hydroponic culture, after two weeks of pre-culture, plants were separated into two batches: the first is treated with Si (1.7 mM and 1mM of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) and the second is not treated with Si. After one week of pretreatment, plants were grown during 12 days with (1mM of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>: +N-Si; +N-Si) or without N (-Si-N; +Si-N). The effects of Si-pretreatment on growth and N-management in oilseed rape were investigated. After this period, plants that were deficient in nitrogen have been supplied with nitrogen for 9 days (D21).

Analysis of Si content in Si treated plants reveals that Si is absorbed by plant. After one week of Si treatment, silicon contents were 7.50 and 1.05 mg.g<sup>-1</sup> of DW in roots of treated with or without Si, respectively. Si taken up by plants up regulates the high affinity nitrate transport system *BnaNRT2.1*, this induction led to a better nitrogen uptake and improved plant growth. In N supplied-plants (+N), Si has no effect on growth and N management. In contrast, in N deprived-plants (-N), Si-pretreated (+Si-N) shown a higher amount of nitrogen uptake between D21 and D12 than untreated plant (-Si-N). This improvement in uptake is due to an induction of roots nitrate transporters (*BnaNRT1.1* and *BnaNRT2.1*).

These results indicate that silicon allows better uptake of nitrogen *via* the up-regulation of the expression of roots nitrate transporter *BnaNRT2.1*, Which is at the origin of the improvement of plant growth. After a period of nitrogen deficiency, plants pretreated with silicon (+Si-N) up-take more nitrogen than control plants (-Si-N), this is due to the up-regulation of the expression of roots nitrate transporters *BnaNRT1.1* and *BnaNRT2.1*.

**KeyWords:** Nitrogen, *Brassica napus* L., Silicon, plants growth, nitrogen transporters

# Effect of silicon on foliar senescence and nitrogen remobilization in *Brassica napus* L.

HADDAD C<sup>1</sup>, ARKOUN M<sup>2</sup>, YVIN JC<sup>2</sup>, ETIENNE P\*<sup>1</sup>, LAINE P\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutrition N,C,S (EVA) - 14032 Caen, France

<sup>2</sup>Centre Mondial de l'Innovation – Groupe Roullier, 18 avenue Franklin Roosevelt, 35401 Saint-Malo, France

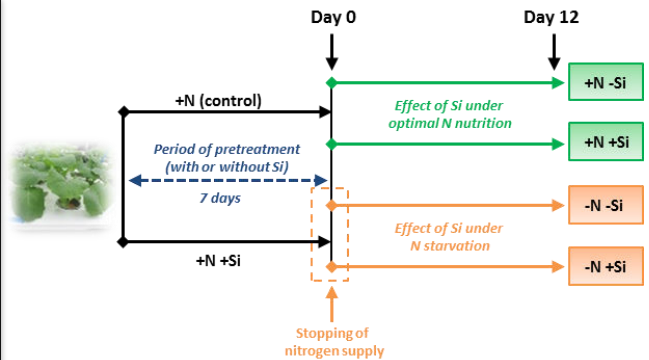
\*PhD supervisors

## INTRODUCTION

*Brassica napus* L. is an oleaginous crop requiring high nitrogen (N) inputs (140-200 Kg N ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup>). Nevertheless, oilseed rape is characterized by a poor nitrogen remobilization due to a drop of leaves with high nitrogen contents (2-2.5%; [1]). Previous studies suggest that a delay of leaf senescence process may increase the leaf life span which allow a better N remobilization especially during abiotic stress. Silicon (Si) is known as a beneficial element for plants especially to protect them against biotic and abiotic stress such as N deficiency. In this context, the aim of our experiment was to study **the effect of Si supply on vegetative growth and remobilization of nitrogen associated with leaf senescence** of oilseed rape grown with or without nitrogen.

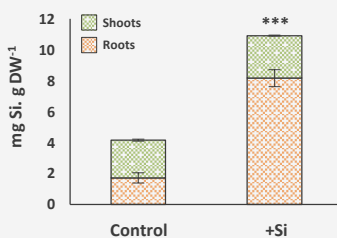
## MATERIALS AND METHODS

After germination on perlite, oilseed rape seedlings were transplanted for one week into a plastic tank (20L) containing a modified Hoagland solution. Plants were then separated into two batches: the first was treated with Nitrogen (+N; as a control) and the second was supplemented with nitrogen and silicon (+N +Si; with a Si concentration of 1.7 mM). After one week of Si pretreatment, plants were separated into four batches and grown during 12 days with (+N-Si; +N+Si) or without (-N-Si; -N+Si) nitrogen. Then, they were harvested for measurements of growth, nitrogen management, chlorophyll content and photosynthetic activity.

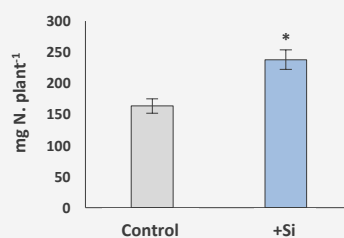


## RESULTS

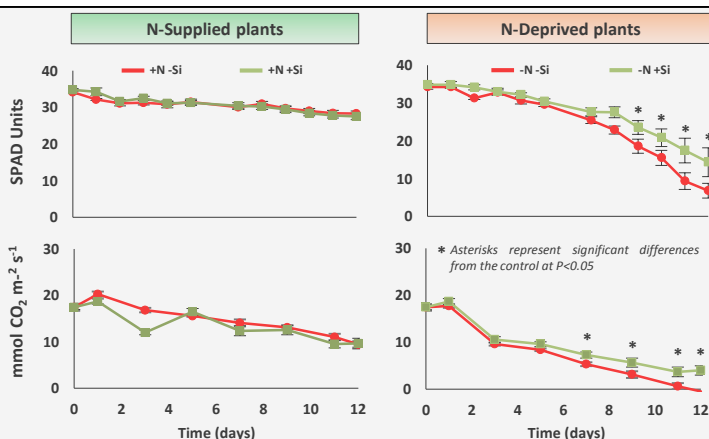
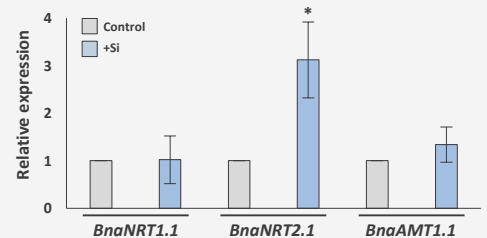
### (A) Silicon content



### (B) Nitrogen uptake



### (C) Gene expression of root nitrogen transporters



- Silicon (Si) is taken up by *Brassica napus* L. and stored mainly in roots (A)
- Si application lead to **a better N uptake** (B) and **upregulates** the high affinity nitrate transport system ***BnaNRT2.1*** (C)
- In +N+Si plants, Si has no effect on chlorophyll content or photosynthetic activity
- In mature leaf of -N+Si plants, Si allow a **maintain of chlorophyll** contents and **photosynthetic activity** associated with a delay of senescence (data not shown)

## CONCLUSION

These results indicate that **silicon** taken up by rapeseed **promotes a delay of senescence induced by N deficiency** and may improve N remobilization by increase leaf life span.

---

**Annexe 3: Acte de congrès rédigé pour «18th International Plant Nutrition Colloquium (IPNC)», du 21 au 24 août 2017 à Copenhague, Danemark. (Présentation d'un poster)**

---

**Effect of silicon on foliar senescence and nitrogen remobilization in *Brassica napus* L.**

HADDAD C<sup>1</sup>, ARKOUN M<sup>2</sup>, YVIN JC<sup>2</sup>, ETIENNE P\*<sup>1</sup>, LAINE P\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutrition N,C,S (EVA) - 14032 Caen, France

<sup>2</sup>Centre Mondial de l'Innovation – Groupe Roullier, 18 avenue Franklin Roosevelt, 35401 Saint-Malo, France

\*PhD supervisors

**Introduction:**

*Brassica napus* L. is an oleaginous crop requiring high nitrogen (N) inputs. Consequently, in despite of an increase of endogenous N remobilization from oldest leaves (source organ) to growing tissues (young leaves and reproductive organs) associated with an acceleration of leaf senescence, N deficiency affects negatively yield and seed quality.

In numerous plants, silicium (Si) is known as a beneficial element especially to protect them against biotic and abiotic stress. Even if oilseed rape is known as plant which no cumulate Si, the aim of this work was to study the effect of Si supply on vegetative growth and management of nitrogen (including leaf senescence progression) of oilseed rape especially in of N deficiency conditions.

**Methods:**

Oilseed rape were grown in a hydroponic culture, after two weeks of pre-culture, plants were separated into two patches: one is treated with Si (+Si: 1.7 mM of sodium silicate and 1mM of labelling nitrogen supplied as <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>15</sup>NO<sub>3</sub>) ) and the other is not treated with silicon (-Si: control) .

After one week of Si pretreatment, plants were grown during 14 days with (1mM of <sup>14</sup>NH<sub>4</sub><sup>14</sup>NO<sub>3</sub>: +N-Si; +N+Si) or without nitrogen (-N-Si; -N+Si) and harvested at 0, 3, 6, 9, and 14 days (Day 0 corresponds to N-deficiency application).

The effects of a Si pretreatment on growth, nitrogen management and foliar senescence in N-deprived and N-supplied oilseed rape were investigated.

**Results and discussion:**

Si contents in Si pre-treated plants reveals that Si is absorbed by oilseed rape. Indeed, after one week of Si supply (*i.e.* 0 day), silicon contents in roots were 6.31 and 0.05 mg.g<sup>-1</sup> of DW in plants treated with or without silicon, respectively.

In N supplied-plants (+N), Si has no effect on growth and nitrogen management. In contrast, in N deprived-plants (-N), mature leaf from plants pretreated by Si (-N+Si) shows a higher leaf



chlorophyll than mature from Si untreated plant (-N-Si). This result suggests that Si pre-treatment allow to maintain leaf chlorophyll contents in leaves of N-deprived plants. In the same time, during the 14 days of N deficiency, Si pretreated plants (-N+Si) have a higher photosynthetic activity than control plants (-N-Si). Finally,  $^{15}\text{N}$  labelling and the molecular senescence indicator reveal a significant delay of N mobilization and senescence progression in mature leaf from -N+Si plants compared to control (-N-Si).

**Conclusions:**

Taken together, these results show that a Si pre-treatment (one week) induces metabolic process which protect *Brassica napus* against abiotic stress such as N deprivation.



# Silicon increases leaf life span in N-deprived *Brassica napus* L.

HADDAD C<sup>1</sup>, ARKOUN M<sup>2</sup>, YVIN JC<sup>2</sup>, ETIENNE P<sup>\*1</sup>, LAINE P<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutrition N,C,S (EVA) - 14032 Caen-France . \*PhD supervisors

<sup>2</sup>Centre Mondial de l'Innovation – Centre de Recherche en Agro-Sciences. 18 avenue Franklin Roosevelt, BP80139 35401 Saint-Malo, France

Scientists present at the 3<sup>rd</sup> Biostimulants Congress are underlined: cylia.haddad@unicaen.fr; philippe.etienne@unicaen.fr; philippe.laine@unicaen.fr



## INTRODUCTION

*Brassica napus* L. is an oleaginous crop requiring high nitrogen (N) inputs (140-200 Kg N ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup>). Nevertheless, oilseed rape is characterized by a poor nitrogen remobilization mainly due to a low leaf N remobilization during the sequential senescence at the vegetative stage. Indeed, leaves fall with a high N contents (2-2.5%) leading to environmental pollutions by nitrate leaching and/or the production of greenhouse gases such as nitrous oxide. To improve the agro-environmental balance of rapeseed by reducing N losses, the use of biostimulants such as silicon (Si) constitutes an interesting alternative. In this context, the aim of our experiment was to study the effect of Si (a beneficial element for some plants especially to protect them against biotic and abiotic stress) on vegetative growth, N uptake and leaf senescence of rapeseed grown with or without N.



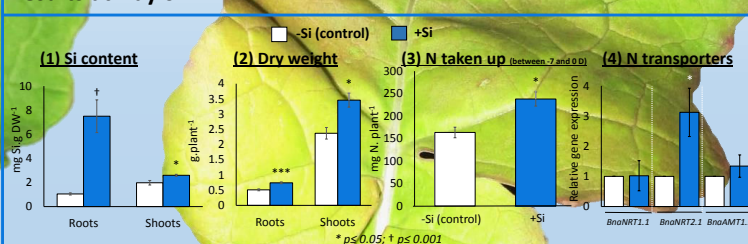
## MATERIALS AND METHODS

After germination on perlite, rapeseed seedlings were transferred for one week into a plastic tank containing nutrient solution. Then, plants were separated into two batches supplied with (+Si: 1.7mM) or without silicon (-Si: Control). After one week of Si pretreatment, plants were separated into four batches and grown during 12 days with (-Si+N; +Si+N) or without (-Si-N; +Si-N) N. Afterward, N-deprived plants have been re-supplied with N for 9 days (D21: -Si+rN; +Si+rN). Then, they were harvested for measurements of growth, Si and N uptakes, chlorophyll content and net photosynthetic activity.

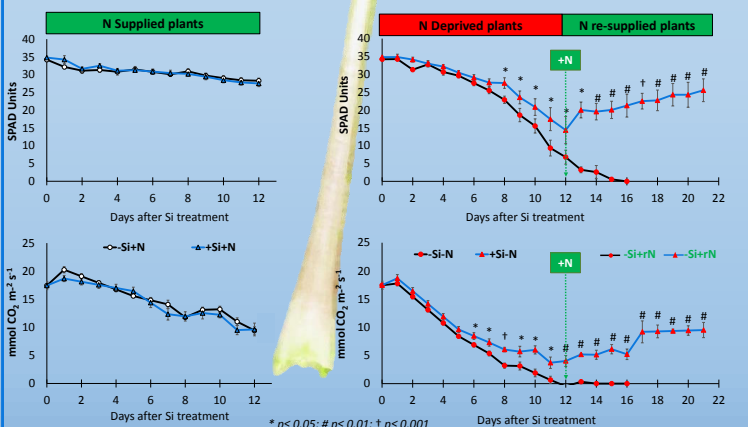
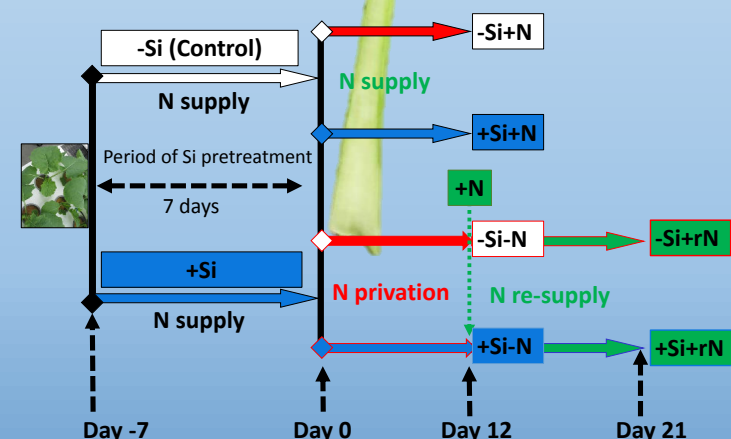


## RESULTS

### Results at Day 0



At D0: Si is taken up by *Brassica napus* L. and stored mainly in roots (1). Si improves the biomass of plants (2), increases N uptake (3) and upregulates nitrate transporter *BnaNRT2.1* (4).



From D0 to D12: In +Si+N plants, Si has no effect on chlorophyll content and photosynthetic activity of mature leaf. In contrast, in +Si-N plants, a Si supply allows a maintain of chlorophyll content and photosynthetic activity associated with a delay of senescence in mature leaf.



## CONCLUSION

Si taken up by rapeseed improves biomass and increases N uptake and root expression of a nitrate transporter gene (*BnaNRT2.1*). In N-deprived plants, Si promotes a delay of leaf senescence allowing a better recovery of chlorophyll contents and photosynthetic activity when plant were re-supplied with N.

Our study showed that Si is a beneficial element for rapeseed especially to cope to N deficiency by allowing it to increase leaf life span. Thus, Si may improve the agro-environmental balance of rapeseed by reducing the asynchronism between N remobilization from leaves and pods filling.

---

**Annexe 4: Acte de congrès rédigé pour «3rd biostimulants world congress », du 27 au 30 novembre 2017 en Floride, États-Unis (Présentation d'un poster)**

---

**Silicon increases leaf life span in N-deprived *Brassica napus* L.**HADDAD C<sup>1</sup>, ARKOUN M<sup>2</sup>, YVIN JC<sup>2</sup>, ETIENNE P<sup>\*1</sup>, LAINE P<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutrition N,C,S (EVA) - 14032 Caen-France . \*PhD supervisors

<sup>2</sup>Centre Mondial de l'Innovation – Centre de Recherche en Agro-Sciences. 18 avenue Franklin Roosevelt, BP80139 35401 Saint-Malo, France

Scientists present at the 3<sup>rd</sup> Biostimulants Congress are underlined: [cylia.haddad@unicaen.fr](mailto:cylia.haddad@unicaen.fr); [philippe.etienne@unicaen.fr](mailto:philippe.etienne@unicaen.fr); [philippe.laine@unicaen.fr](mailto:philippe.laine@unicaen.fr)

**Abstract**

*Brassica napus* is usually characterized by low nitrogen (N) use efficiency and especially by a low remobilization of N. Indeed, during vegetative development, senescing leaves fall with high N content and contribute to environmental pollution. The use of biostimulants constitutes an alternative to reduce N losses by limiting asynchronism between leaf N remobilization and seed filling period. In this context, the effect of silicon (Si) was studied on growth parameters of oilseed rape previously supplied with (+Si) or without Si (-Si) and then supplied or deprived of N during 12 days. After that, all plants were supplied with N until the end of the experiment. Our results show that Si increases expression of a nitrate transporter gene and N uptake and improves growth of N supplied plants while no effect was observed in N deprived plants. In N deprived-plants, leaf of Si treated plants show a higher chlorophyll content and photosynthetic activity than -Si plants. These results were consolidated at molecular level using *SAG12/Cab* indicator which shows a delay of leaf senescence.

Thus, under N stress conditions, Si supply slows down the progression of leaf senescence and maintains photosynthetic activity. Moreover, when N deprived plants were resupply with N, a greening associated with an increase of photosynthetic activity were observed in senescing leaves. All these results suggest a biostimulaton and beneficial effects of Si and especially an increase of leaf life span which may allow a better synchronism between N leaf remobilization and seed filling at the reproductive stage.



---

**Annexe 5: Acte de congrès rédigé pour «21<sup>ième</sup> Journées de l'école doctorale (EdNBISE)», du 22 au 23 mars 2018 à Rouen, France (Présentation orale)**

---

**Effect of Silicon supply on leaf senescence in nitrogen deprived *Brassica napus* L. plants**

HADDAD C<sup>1</sup>, ARKOUN M<sup>2</sup>, YVIN JC<sup>2</sup>, ETIENNE P<sup>\*1</sup>, LAINE P<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutrition N,C,S (EVA) - 14032 Caen-France . \*PhD supervisors

<sup>2</sup>Centre Mondial de l'Innovation – Centre de Recherche en Agro-Sciences. 18 avenue Franklin Roosevelt, BP80139 35401 Saint-Malo, France

Doctoral fellowship co-funded by European Union, Normandy County Council, in the framework of the ERDF-ESF operational programme 2014-2020 and the CMI group Roullier

**Abstract**

*Brassica napus*.L is an oleaginous is characterized by high nitrogen (N) inputs and senescing leaves falling with high N content, both leading to environmental pollution. Silicon (Si) is known as a beneficial element for plants especially to protect them against biotic and abiotic stresses. The aim of our work was to study the effect of Si on growth and management of N in rapeseed. After two weeks in hydroponic conditions, plants were separated into two batches: the first was treated with 1.7 mM of Si and 1mM of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> while the second received only 1mM of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>(control). After one week of this Si pretreatment (Day0), plants were grown during 12 days with (1mM of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>: -Si+N; -Si+N) or without N (-Si-N; +Si-N). After this Period (Day12), N deprived plants were re-supplied with 1mM of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> for 9 days (Day 21).Analysis of plants treated with Si revealed that Si was well taken up by plants. After one week of Si treatment (at Day 0), silicon Amount was higher in +Si than -Si plants. Moreover, molecular analysis showed that Si up Regulates the gene encoding high affinity nitrate transporter *BnaNRT2.1*, this induction leading to a better nitrogen uptake associated with an increase of plant growth.

At Day 12, in N supplied plants (+Si+N), silicon had no effect on growth, chlorophyll content, photosynthetic activity and N management. In contrast, in N deprived plants (+Si-N), Si Induced a preservation of chlorophyll content and photosynthetic activity in mature leaf compared to -Si-N plants. Consequently, when all plants were re-supplied with N, an increase of N uptake associated with and induction of genes encoding low and high nitrate transporters (*BnaNRT1.1* and *BnaNRT2.1*, respectively)were only observed in +Si-N plants. To our knowledge, this study is the first to demonstrate that a Si supply is able to delay leaf senescence of N deprived plants and to up-regulate the expression of roots nitrate transporters leading to an increase of plant growth.



---

**Annexe 6: Acte de congrès rédigé pour «20th Nitrogen Workshop, du 25 au 27 juin 2018 à Rennes, France (Présentation orale)**

---

**Silicon Increases Leaf Life Span In N-deprived *Brassica napus* L.**

HADDAD C<sup>1</sup>, ARKOUN M<sup>2</sup>, YVIN JC<sup>2</sup>, ETIENNE P<sup>\*1</sup>, LAINE P<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutrition N,C,S (EVA), France . \*PhD supervisors ; <sup>2</sup>Centre Mondial de l'Innovation – Roullier, France

**INTRODUCTION**

*Brassica napus* L. is an oleaginous crop requiring high nitrogen (N) inputs (140-200 kg N ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup>). Nevertheless, rapeseed is characterized by a poor N remobilization (Avice and Etienne, 2014). Indeed, leaves fall with a high N contents (2-2.5%) that may lead to environmental pollutions by nitrate leaching and the production of greenhouse gases such as nitrous oxide. To improve the agro-environmental balance of rapeseed, the use of biostimulants such as silicon (Si) constitutes an interesting alternative. In this context, the aim of our experiment was to study the effect of Si (a beneficial element for some plants especially to protect them against biotic and abiotic stress; Epstein, 1999) on vegetative growth, N uptake and leaf senescence progression of rapeseed subjected (or not) to N starvation.

**MATERIAL AND METHODS**

After germination on perlite, rapeseed seedlings were transferred for one week into a plastic tank containing nutrient solution with 1 mM N. Then, plants were separated into two batches: the first was supplied with the same nutrient solution with the addition of silicon (+Si: 1.7mM), and the second (-Si: 0.0 mM) was supplied with the nutrient solution only. After one week of Si pretreatment period, at day 0, each batch was again separated into two groups and grown during 12 days with (-Si+N; +Si+N) or without N (-Si-N; +Si-N). Afterward, N-deprived plants have been re-supplied with N for 9 days (D21: -Si+rN; +Si+rN). At the end of Si pretreatment, plants were harvested for measurements of Si uptake (monitored by a colorimetric method), N uptake (determined with a continuous flow isotope mass spectrometer), and relative root expression of *BnaNRT1.1*, *BnaNRT2.1*, and *BnaAMT1.1* genes involved in nitrate (NRTs) and ammonium (AMT) uptake. Chlorophyll content and net photosynthetic activity were performed daily by a SPAD-502 chlorophyll meter and LI-COR, respectively, once the beginning of N starvation (day 0).

**RESULTS AND DISCUSSION**

Our study showed that rapeseed, which is considered a non-Si accumulator species (Hodson et al., 2005), is able to take up and store Si in roots at the end of the Si pretreatment (Fig. 1A). After a short period of Si treatment (7 days), the growth of +Si plants is increased by 1.45 fold compared to -Si plants (data not shown). This biomass increase is associated with an increase in the amount of N in +Si plants (Fig. 1B) and with induction (by 3 fold) of expression of the gene that encodes the *BnaNRT2.1* nitrate transporter (Fig. 1C).



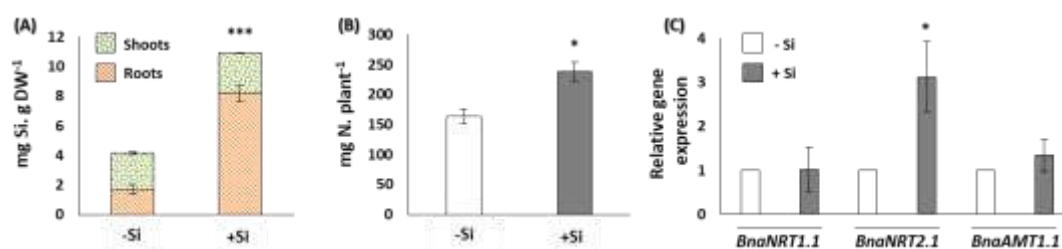


Figure 1. Silicon (Si) content (A), total nitrogen (N) amounts (B) and relative root expression of the *BnaNRT1.1*, *BnaNRT2.1*, and *BnaAMT1.1* genes (C) at the end of the Si pretreatment for rapeseed. Asterisks represent significant differences from the control at  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*)

Under N starvation (from day 0 to 12), this study has shown that from day 5 and 7 the leaf SPAD and net photosynthetic activity values of +Si plants were significantly higher than those of -Si plants (Figs. 2A and B). These two parameters are usually considered as physiological indicators of leaf senescence (Gombert et al., 2006), and our result suggest that a Si pretreatment induces a delay in leaf senescence in +Si plants submitted to N starvation compared to -Si plants. When N-deprived plants were resupplied with N (days 12 to 21), senescing mature leaves from +Si plants recovered net photosynthetic activity (Fig. 2B) and turned green again (Fig. 2A), while mature leaves from -Si plants continue to senesce and fall at day 16, confirming a reversal of leaf senescence progression only in plants pretreated with Si.

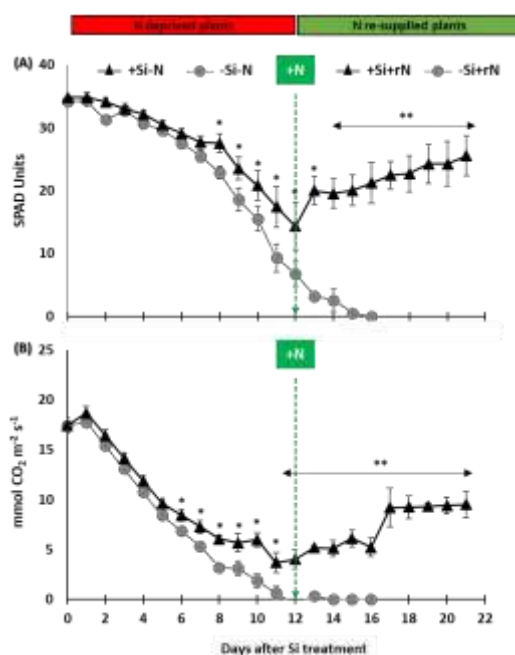


Figure 2. Change in SPAD values (A) and net photosynthetic activity (B) of mature leaf from rapeseed. Asterisks represent significant differences from the control at  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*).

## CONCLUSION

Si taken up by rapeseed improves biomass and increases N uptake and root expression of a nitrate transporter gene (*BnaNRT2.1*). In N-deprived plants, Si promotes a delay of leaf senescence allowing a better recovery of chlorophyll contents and photosynthetic activity





when plant were re-supplied with N. Our study showed that Si is a beneficial element for rapeseed especially to cope to N deficiency by allowing it to increase leaf life span. Thus, Si may improve the agro-environmental balance of rapeseed by reducing the asynchronism between N remobilization from leaves and pods filling.



**Titre : Effet d'un apport de silicium sur la sénescence foliaire et les performances agronomiques du colza**  
EdNBISE-UFR des Sciences-Université de Caen-Thèse de l'Université de Caen Normandie.

**Résumé :** Le colza (*Brassica napus* L.) est une plante de grande culture nécessitant de forts intrants azotés et présentant une faible Efficacité d'Utilisation de l'Azote (EUA) principalement due à une faible efficacité de remobilisation cet élément durant la sénescence foliaire. Actuellement, une amélioration du bilan agro-environnemental de la culture du colza, nécessite la mise au point de nouvelles pratiques culturales permettant de maintenir (voire d'améliorer) son rendement tout en limitant les doses d'intrants azotés. Dans ce contexte, l'utilisation d'éléments bénéfiques tels que le silicium (Si) dont les effets ont déjà été démontrés dans la tolérance à certains stress nutritionnels (phosphore et potassium) constitue une alternative intéressante. Les objectifs de cette étude visent à étudier l'effet du Si (i) sur la progression de la sénescence foliaire, l'absorption et la remobilisation de l'azote et les performances agronomiques du colza cultivé en hydroponie ou en conditions de plein champ et soumis ou non à une limitation ou une privation en azote. Nos travaux montrent, qu'en dépit de son caractère faiblement accumulateur en Si, le colza absorbe le Si puis le stocke essentiellement au niveau racinaire. Par ailleurs, un apport de Si de courte durée (7 jours ; 1,7 mM) à des jeunes plantes privées en azote provoque un retard de sénescence des feuilles matures associé un maintien de leur teneur en chlorophylles et de leur activité photosynthétique. De plus, au champ, un apport de Si (12 kg ha<sup>-1</sup>) à des plantes cultivées avec 160 kg N ha<sup>-1</sup> s'accompagne d'une augmentation du rendement grainier (+4,2 quintaux ha<sup>-1</sup>). L'utilisation de l'indice agronomique «Agronomic Nitrogen Recovery (ANR)» combinée à l'étude de l'expression de gènes codant des transporteurs d'azote (*BnaNRT1.1*, *BnaNRT2.1*, *BnaAMT1.1*) montrent que le Si agit notamment en stimulant l'absorption de l'azote chez le colza. Enfin, une analyse différentielle par RNAseq des transcriptomes racinaires de jeunes plantes traitées ou non avec du Si pendant une courte durée (7 jours ; 1,7 mM), montre que le Si module l'expression de 1079 gènes, 334 étant induits et 745 réprimés. Ce résultat indique qu'en plus de son rôle mécanique, le Si exerce également un rôle signalétique.

**Mots clés :** Absorption, azote, colza, indicateurs agronomiques, RNAseq, sénescence, silicium

**Title: Effect of silicon supply on foliar senescence and agronomic performances of rapeseed**

**Abstract:** Rapeseed (*Brassica napus* L.) is a crop that requires high nitrogen inputs and has a low Nitrogen Utilization Efficiency (NUE) mainly due to a low remobilization efficiency during leaf senescence. Currently, an improvement of the agro-environmental balance of rapeseed, requires the development of new cultural practices to maintain (or even improve) its yield in response to low nitrogen inputs. In this context, the use of beneficial element such as silicon (Si) with previously demonstrated effects on tolerance to some nutritional stress (phosphorus and potassium), constitutes an interesting alternative. The objectives of this study are to investigate the effect of Si on the progression of leaf senescence, nitrogen uptake and remobilization but also on agronomic performances of rapeseed grown in hydroponics or in field conditions and submitted or not to a limitation or deprivation of nitrogen inputs. Our work shows that despite being considered as a low Si accumulator, rapeseed takes up and stores Si mainly in its roots. In addition, a Si supply for a short time (7 days; 1.7 mM) to young plants deprived of nitrogen leads to a delay of senescence of mature leaves associated with a maintenance of their chlorophyll content and their photosynthetic activity. In addition, in field conditions, a supply of Si (12 kg ha<sup>-1</sup>) to plants grown with 160 kg N ha<sup>-1</sup> leads to an increase of yield (+4.2 quintals ha<sup>-1</sup>). Furthermore, calculation of the "Agronomic Nitrogen Recovery (ANR)" combined with the expression of genes encoding nitrogen transporters (*BnaNRT1.1*, *BnaNRT2.1*, and *BnaAMT1.1*) shows that Si increases the nitrogen uptake. Finally, a differential analysis by RNAseq of roots transcriptomes from young plants treated or not with Si for a short time (7 days; 1.7 mM), shows that Si modulates the expression of 1079 genes, 334 being induced and 745 repressed. This result indicates that in addition to its mechanical role, Si acts also a signal, a role very poorly demonstrated in the literature.

**Keywords:** agronomic indexes, nitrogen, rapeseed, RNAseq, senescence, silicon, uptake