



HAL
open science

Autophagie et ressources azotées : contrôle nutritionnel et recyclage métabolique

Anne Guiboileau

► **To cite this version:**

Anne Guiboileau. Autophagie et ressources azotées : contrôle nutritionnel et recyclage métabolique. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris 11, 2010. Français. NNT: . tel-04029975

HAL Id: tel-04029975

<https://theses.hal.science/tel-04029975>

Submitted on 29 Mar 2023

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.

Université Paris Sud XI
Ecole Doctorale Sciences du Végétal

THESE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du grade de docteur de l'Université Paris Sud XI

Présentée par

Anne Guiboileau



**Autophagie et ressources azotées :
contrôle nutritionnel et recyclage métabolique**



Directrice de thèse

Céline Masclaux-Daubresse

date de soutenance : 14 octobre 2011

Devant le jury composé de :

Renaud Brouquisse

Rapporteur

Nicolaus von Wirén

Rapporteur

Jean-Christophe Avice

Examineur

Karin Krupinska

Examineur

Graham Noctor

Examineur

Céline Masclaux-Daubresse

Directrice de thèse

<i>I. INTRODUCTION GENERALE</i>	<i>1</i>
A. L'autophagie : bases morphologiques et moléculaires	3
1. Observations morphologiques de l'autophagie	3
2. Les différents types d'autophagie	4
3. La machinerie moléculaire de l'autophagie	6
4. La sélectivité de l'autophagie	9
5. Des méthodes pour l'étude du flux autophagique	14
B. L'autophagie : rôles et régulations	16
1. Chez les animaux	16
2. Chez les plantes	19
C. Les plantes face à la limitation en azote	25
1. Réponse des plantes à la limitation en azote	25
2. Processus de recyclage et mobilisation de l'azote	27
D. Quels rôles pour l'autophagie en réponse à une carence et au cours du développement ?	30
E. Objectifs de la thèse	32
<i>II. Partie 1 : REGULATION OF AUTOPHAGY BY AtTOR</i>	<i>34</i>
A. Introduction	34
B. Results	36
1. Autophagic bodies are accumulating in root cells of TOR RNAi lines	36
2. Autophagosome flux is controlled by TOR	38
3. Detection of ATG8 forms in AtTOR backgrounds using western blots	39
4. AtTOR activity is essential for the direct autophagic flux regulation	40
C. Discussion	41
D. Materials and Methods	43
1. Plant materials and growth conditions	43
2. Concanamycin A for autophagic bodies observation	44
3. Rapamycin treatment	44
4. Generation of GFP-ATG8e and RFP-ATG8e transgenic plants and observation of autophagosome flux in root cells	44
5. Protein extraction and immunoblot analysis	45
<i>III. Partie 2 : L'AUTOPHAGIE, UNE ETAPE CLEF DU RECYCLAGE DE L'AZOTE</i>	<i>47</i>
A. L'autophagie participe à la remobilisation de l'azote	48
B. Diagnostique métabolique des mutants d'autophagie	63

1. Biomasse	63
2. Perturbations du rapport C/N	64
3. Modifications des contenus en métabolites carbonés	65
4. Dosage des différents composés azotés	67
5. Métabolome	70
6. Modifications des activités impliquées dans l'assimilation, le recyclage et le transport du carbone et de l'azote	72
7. Quelles cibles pour l'autophagie ?	77
C. Discussion	80
1. Diagnostique physiologique et métabolique des mutants d'autophagie	80
2. Les signatures métaboliques répondent-elles à une adaptation à la limitation en azote ?	82
3. Autophagie : turnover des protéines et sélectivité	83
4. Le phénotype métabolique des mutants d'autophagie est-il lié à leur phénotype de sénescence ?	84
5. Autophagie, mort cellulaire et gestion du stress	85
IV. CONCLUSION	87
V. MATERIELS & METHODES	91
A. Matériel végétal	91
1. Les mutants d'autophagie	91
2. Les doubles mutants : autophagie et acide salicylique	91
3. Les plantes transgéniques <i>AtTOR</i> et <i>ScFKBP12</i>	91
4. Les fusions et les croisements	91
B. Conditions de culture	92
1. Culture en conditions contrôlées	92
2. Culture sur sable pour le marquage ¹⁵ N	92
3. Culture <i>in vitro</i>	93
C. Marquage isotopique à l'azote 15	93
D. Extractions et dosages métaboliques	94
1. Analyse de la composition individuelle en acides aminés et dosage de l'ammonium	94
2. Dosage des sucres solubles et de l'amidon	94
3. Dosage des chlorophylles	95
4. Dosage des anthocyanes	96
5. Métabolome par GC-MS	96
E. Dosages d'activités enzymatiques	96
1. Glutamine Synthétase	96
2. Glutamate Déshydrogénase	97
3. Activités protéasiques	97

F. Biochimie	98
1. Extraction des protéines et dosage par la méthode de Bradford	98
2. SDS-Page et western-Blot	98
G. Extraction d'acides nucléiques	99
1. Extraction d'ADN pour le génotypage des croisements	99
2. Extraction des ARN totaux	99
H. Transcriptome	100
I. Cytologie et microscopie	101
1. Coloration au carmin aluné vert d'iode	101
2. Bleu Trypan	101
VI. Références bibliographiques	102
VII. Annexes	115

I. INTRODUCTION GENERALE

L'utilisation des engrais azotés a fortement contribué à l'augmentation de la production des produits agricoles nécessaires à la nutrition de la population mondiale en constante augmentation. L'azote retrouvé chez les animaux et les humains provient d'une façon ou d'une autre des plantes et des microbes puisque ce sont les seuls organismes capables de convertir l'azote minéral en azote organique sous la forme d'acides aminés ou encore de nucléotides, « matériaux de construction » des protéines et des acides nucléiques essentiels à la vie.

Malgré le fort bénéfice tiré de l'utilisation d'engrais pour la production des rendements, leur utilisation massive entraîne également des risques sanitaires et environnementaux. En effet, ces engrais azotés riches en nitrate très soluble dans l'eau sont la cause majeure de la pollution des réserves d'eau potable. Dans une perspective de développement durable, il est donc primordial d'améliorer le métabolisme du recyclage de l'azote au sein de la plante au cours du développement afin d'augmenter l'efficacité d'utilisation de l'azote. Cet enjeu est d'autant plus important si l'on considère à la fois la demande croissante en produits agricoles due à l'augmentation de la population mondiale, le coût très élevé des engrais azotés et la pollution causée par l'application en excès de nitrate pour fertiliser les sols cultivés. Le but est donc de limiter l'apport d'engrais azotés tout en maintenant le rendement et la qualité des produits agricoles.

Les organismes vivants sont souvent confrontés à des situations de stress comme la carence nutritionnelle, la sécheresse ou encore le froid, liées aux fluctuations de leur environnement. Ils ont développé des stratégies afin de s'adapter. La remobilisation des nutriments est un processus qui leur permet une économie nutritionnelle et un recyclage des nutriments limitants. La remobilisation de l'azote s'effectue le plus souvent lors du vieillissement des organes de la plante et en particulier lorsque les feuilles entrent en sénescence. Les premiers organites touchés au cours de la sénescence foliaire sont les chloroplastes, réservoir d'azote majoritaire de la plante. Malgré leur importance, les mécanismes de dégradation et recyclage des protéines chloroplastiques et non-chloroplastiques restent mal connus.

L'autophagie, du grec *αυτο* (soi-même) et *φαγειν* (manger), est la seule voie, alternative à celle du protéasome, capable de dégrader massivement des macromolécules et des organites. Processus de dégradation vésiculaire, l'autophagie est décrite chez les animaux et la levure comme un mécanisme permettant le recyclage des constituants cellulaires et des nutriments. Ce pourrait-il qu'elle soit la clef du recyclage des nutriments et de l'azote chez les plantes ?

Mon travail a donc porté sur l'étude du rôle de l'autophagie dans le recyclage nutritionnel chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Après une introduction générale, les travaux réalisés sont présentés dans ce manuscrit sous la forme de deux parties. La première partie de ce manuscrit s'intéresse à la régulation de l'autophagie par la protéine TOR en fonction de la disponibilité en azote. La deuxième partie présente la caractérisation physiologique des mutants d'autophagie. Cette partie s'articule elle-même en deux sous parties qui s'intéressent respectivement (i) à l'autophagie en tant que processus essentiel à la remobilisation de l'azote au niveau de la plante entière et (ii) au diagnostic métabolique des mutants d'autophagie face à la limitation en azote.

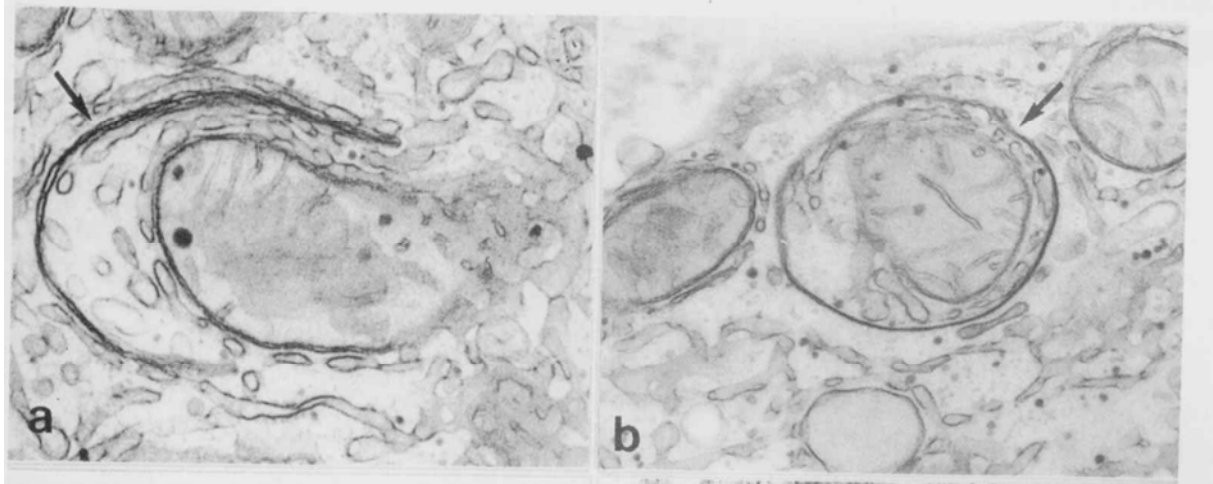


Figure 1. Photographies présentant la formation de l'autophagosome. Les flèches indiquent la double membrane, spécifique de cette vésicule. (a) La double membrane incurvée s'étend pour englober une mitochondrie. (b) L'autophagosome est clos et contient une mitochondrie et du réticulum endoplasmique. (D'après Yi and Tang, 1999).

A. L'autophagie : bases morphologiques et moléculaires

1. Observations morphologiques de l'autophagie

La découverte de l'autophagie par Christian de Duve est contemporaine de celle du lysosome. C'est lui qui introduisit pour la première fois le terme « autophagie » lors du « CIBA Foundation Symposium » sur le lysosome en 1963.

Les premières observations de ce qu'on appellera plus tard autophagosome ont été réalisées grâce à la microscopie électronique sur des cellules de mammifères dans les années 60. Pour la première fois, des chercheurs ont observé des structures enveloppées d'une double membrane.

Par la suite, plusieurs études ont permis de décrire le processus d'autophagie en plusieurs étapes (Suzuki & Ohsumi, 2007). Il commence par la détection de signaux de l'environnement qui sont transmis au niveau du site d'assemblage du phagophore ou de la structure pré-autophagosomale (PAS ; Pre-Autophagosomal Structure) (Suzuki & Ohsumi, 2007). Une membrane d'isolation se forme alors à partir de protéines et de lipides recrutés au niveau de cette structure. La membrane, alors composée de deux bicouches lipidiques s'incurve et vient englober des portions de cytoplasmes et des organelles. A ce moment, la structure formée est appelée le phagophore. La membrane, qui continue de s'étendre, fusionne pour former l'autophagosome (Figure 1 ; Yi & Tang, 1999). L'autophagosome, vésicule délimitée par une double membrane est véhiculé jusqu'à la vacuole et sa membrane externe fusionne avec celle de la vacuole. Un corps autophagique, constitué de la membrane interne de l'autophagosome et de son contenu, est libéré dans la lumière de la vacuole. Ce corps autophagique est dégradé par les enzymes lytiques et les protéases vacuolaires. Les acides aminés et autres squelettes carbonés qui en résultent sont exportés vers le cytosol pour y être recyclés.

La question portant sur l'origine de la membrane de l'autophagosome a été et reste d'actualité. Néanmoins, de récentes publications apportent des éléments de réponse. Le réticulum endoplasmique, la membrane externe des mitochondries, le réseau Golgi/trans Golgi network/endosome ou encore la membrane plasmique ont été

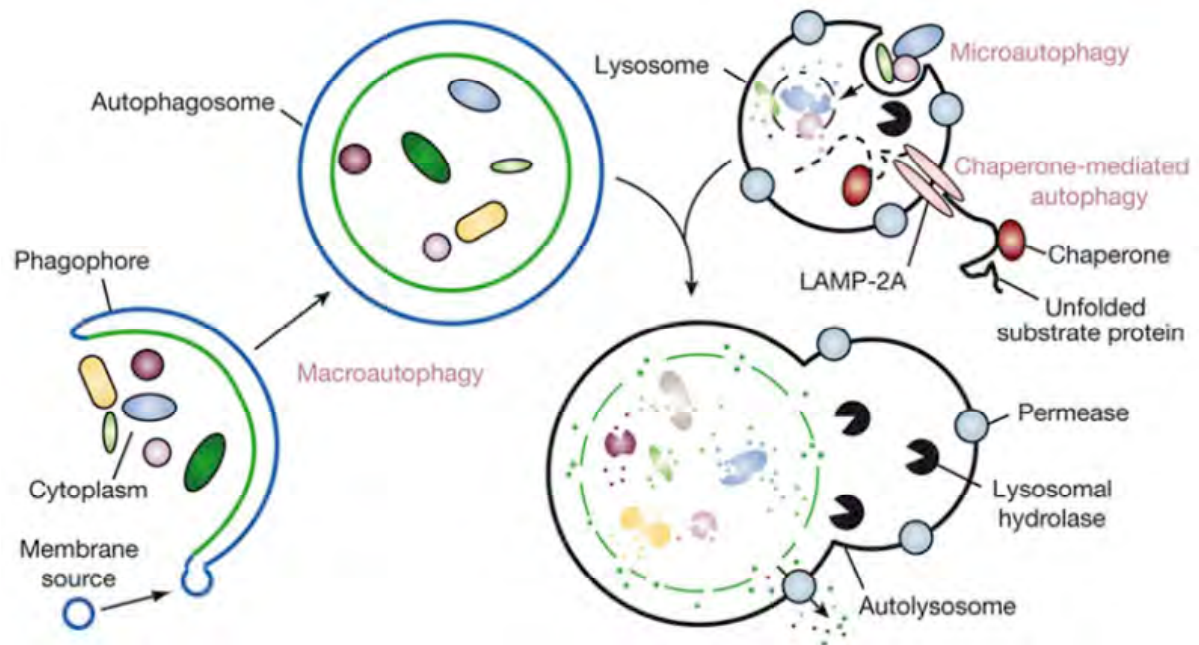


Figure 2. Schéma présentant les différents types d'autophagie.

La microautophagie fait référence à la séquestration de composés cytosoliques directement par le lysosome grâce à des invaginations de sa membrane. La fonction de ce processus n'est pas connue chez les eucaryotes par contre des processus assimilés sont impliqués dans la dégradation sélective d'organelles chez les champignons. Dans le cas de la macroautophagie, les portions de cytoplasme sont séquestrées par une vésicule cytosolique à double membrane, l'autophagosome. L'autophagosome se forme par extension du phagophore. L'origine de la membrane est à ce jour inconnue. L'hydrolyse de la membrane interne de l'autophagosome et de son contenu se produit dans l'autolysosome et les molécules qui en résultent sont exportées vers le cytosol *via* des perméases membranaires. La CMA (Chaperone Mediated Autophagy) fait référence à la translocation directe de protéines à travers la membrane du lysosome *via* l'action de la protéine chaperone hsc70 et du récepteur membranaire LAMP-2A (Lysosome-Associated Membrane Protein type 2A) (D'après Mizushima *et al.*, 2008).

proposés comme origines de la membrane de l'autophagosome (Axe *et al.*, 2008 ; Hailey *et al.*, 2010 ; Manjithaya *et al.*, 2010; Mari *et al.*, 2010 ; Beau *et al.*, 2011)

2. Les différents types d'autophagie

Chez les mammifères, trois types de voies existent pour l'acheminement d'un contenu cytosolique vers le lysosome : la micro-autophagie, la macro-autophagie et la « Chaperone-mediated autophagy » (CMA) (Figure 2 ; Mizushima *et al.*, 2008). Bien que ces trois voies partagent la même destinée, c'est-à-dire le lysosome, celles-ci sont différentes du point de vue de leurs mécanismes.

2.1. Chaperone mediated autophagy

Contrairement à la micro- et la macro-autophagie lors desquelles des régions entières de cytosol sont séquestrées puis délivrées au lysosome, la CMA (Chaperone Mediated Autophagy) ne cible qu'une protéine cytosolique unique qui sera directement délivrée dans la lumière du lysosome *via* des récepteurs spécifiques (Kon & Cuervo, 2010; Kaushik *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2011). La CMA transporte chaque protéine cible, une par une, vers le lysosome afin qu'elle y soit dégradée. Pour que la protéine soit reconnue pour la dégradation *via* la CMA, celle-ci doit absolument avoir dans sa séquence d'acides aminés le motif KFERQ (Dice *et al.*, 1990). Ce motif, reconnu par une protéine chaperone cytosolique, Hsc70 permet à la protéine cible d'être véhiculée jusqu'à la membrane du lysosome. Le complexe formé par la protéine cible et les protéines chaperones interagit avec la queue cytosolique de la protéine membranaire LAMP-2A (lysosome-associated membrane protein type 2A) qui agit comme un récepteur (Cuervo & Dice, 1996). La protéine cible est directement transloquée à travers la membrane lysosomale, grâce à la présence de la forme lysosomale d'Hsc70. Dans ce schéma, la protéine cible n'est jamais séquestrée au sein d'une vésicule, comme c'est le cas pour les autres voies de l'autophagie (Figure 3 ; Kaushik *et al.*, 2011).

Bien que la CMA présente des différences avec les autres voies de l'autophagie, elle est capable de fournir de l'énergie lorsque les nutriments sont limitants et elle participe au contrôle qualité des protéines. Elle fonctionnerait donc de façon interdépendante avec les autres voies et pourrait compenser le dysfonctionnement de l'une d'entre elles.

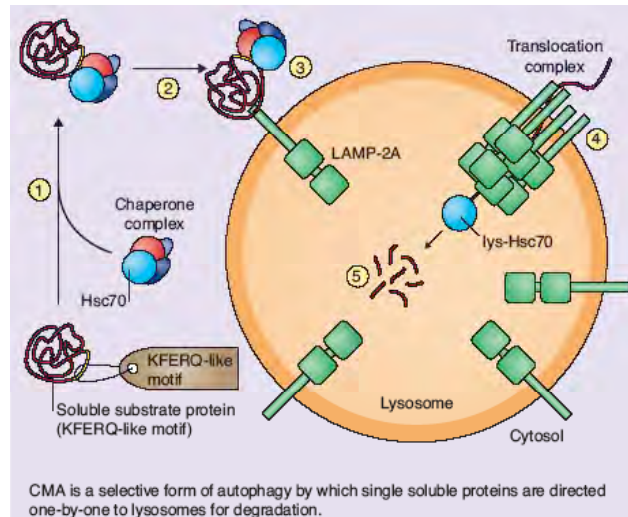


Figure 3. Figure présentant les étapes de la « Chaperone Mediated Autophagy »

- ① Fixation de la protéine chaperone HSC70 sur le motif de reconnaissance de la protéine cible
 - ② Trafic cytosolique du complexe cible-HSC70
 - ③ Fixation du complexe sur le récepteur membranaire LAMP-2A (Lysosome-Associated Membrane Protein type 2 A)
 - ④ Translocation de la protéine à travers la membrane, assistée par les HSC intra-lysosomales
 - ⑤ Dégradation par les hydrolases lysosomales
- (D'après Kaushik *et al.*, 2011).

Le cœur de la machinerie moléculaire

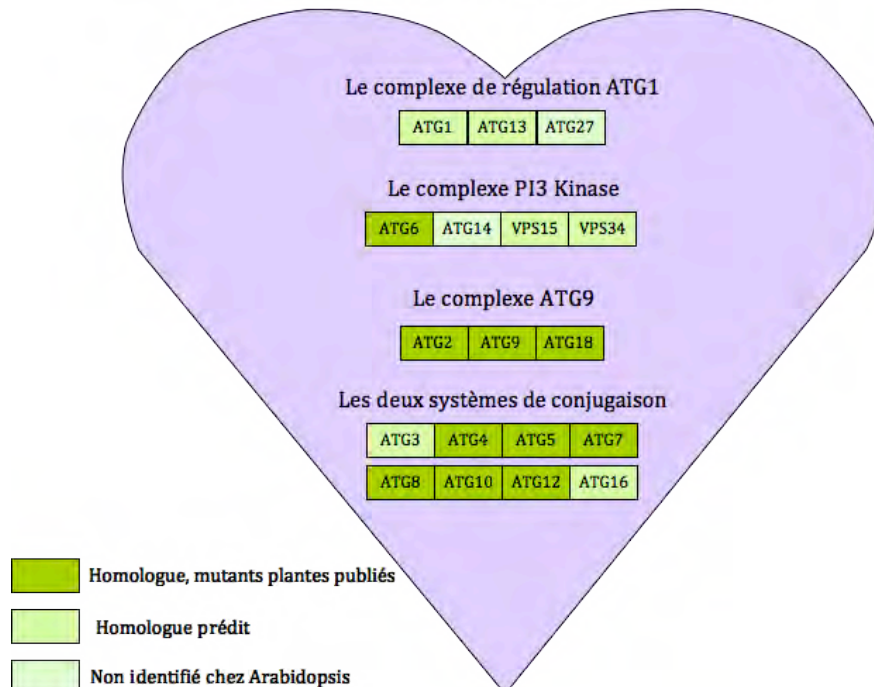


Figure 4. Illustration des différentes protéines ATG participant au cœur de la machinerie moléculaire de l'autophagie.

Sont représentées en vert foncé les protéines homologues de la levure dont des mutants sont publiés chez *Arabidopsis thaliana*, en vert clair les protéines homologues prédites et enfin en vert pâle les protéines non identifiées à ce jour chez *Arabidopsis thaliana* (D'après Doelling *et al.*, 2002 ; Thompson and Vierstra, 2005 ; Bassham *et al.*, 2006 ; Chung *et al.*, 2010).

Cette voie autophagique n'a jamais été décrite chez les plantes.

2.2. Micro-autophagie

Une voie alternative décrite sous le terme de micro-autophagie fait référence à l'observation en microscopie électronique d'invagination de la membrane du lysosome englobant des parties du cytosol qui sont délivrées dans la lumière du lysosome pour y être dégradées. Cette voie est uniquement décrite sur la base de données structurales et jusqu'à ce jour, aucune base moléculaire de ce processus n'a été détaillée. Des évènements similaires, c'est-à-dire l'invagination et la formation de vésicules intravacuolaires ont été observées dans les cellules du méristème racinaire de maïs (Matile & Moor, 1968). Par ailleurs, en observant par microscopie électronique le méristème racinaire d'*Euphorbia*, des petites vésicules appelées pro-vacuoles ont été identifiées. Ces pro-vacuoles prennent une structure tubulaire, forment des extensions jusqu'à prendre la forme d'une cage qui englobe des constituants cytoplasmiques (Marty, 1978). Ces observations suggèrent l'existence de la micro-autophagie chez les plantes.

2.3. Macro-autophagie

La dernière voie présentée est certainement la plus décrite dans la littérature. Elle est d'ailleurs souvent appelée par le terme plus général : autophagie. La description de cette voie correspond à celle faite dans le paragraphe A.1. Durant la macro-autophagie, une vésicule à double membrane appelée autophagosome est formée pour englober des protéines et/ou des organelles. Cet autophagosome fusionne avec le lysosome, larguant à l'intérieur de celui-ci son contenu pour qu'il y soit dégradé. Il est important de noter que l'autophagosome n'est retrouvé que dans le processus de macro-autophagie et que sa caractéristique fondamentale est la présence de la double membrane.

Nom du gène	AGI	Références
Complexe de régulation ATG1		
<i>ATG1a</i>	At2g37840	
<i>ATG1b</i>	At3g53930	Yoshimoto <i>et al.</i> , 2010
<i>ATG1c</i>	At3g61960	
<i>ATG13a</i>	At3g49590	Yoshimoto <i>et al.</i> , 2010
<i>ATG13b</i>	At3g18770	
Complexe PI3K		
<i>ATG6</i>	At3g61710	Fujiki <i>et al.</i> , 2007 ; Patel & Dinesh-Kumar 2008
<i>VPS34</i>		
Complexe ATG9		
<i>ATG2</i>	At3g19190	Inoue <i>et al.</i> , 2006
<i>ATG9</i>	At2g31260	Hanaoka <i>et al.</i> , 2002
<i>ATG18a</i>	At3g62770	
<i>ATG18b</i>	At4g30510	
<i>ATG18c</i>	At2g40810	
<i>ATG18d</i>	At3g56440	Xiong <i>et al.</i> , 2005
<i>ATG18e</i>	At5g05150	
<i>ATG18f</i>	At5g54730	
<i>ATG18g</i>	At1g03380	
<i>ATG18h</i>	At1g54710	
Systemes de conjugaison		
<i>ATG3</i>	At5g61500	
<i>ATG4a</i>	At2g44140	Yoshimoto <i>et al.</i> , 2004
<i>ATG4b</i>	At3g59950	
<i>ATG7</i>	At5g45900	Doelling <i>et al.</i> , 2002
<i>ATG8a</i>	At4g21980	
<i>ATG8b</i>	At4g04620	
<i>ATG8c</i>	At1g62040	
<i>ATG8d</i>	At2g05630	Doelling <i>et al.</i> , 2002 ; Thompson <i>et al.</i> , 2005 ; Chung <i>et al.</i> , 2010 ; Slavikova <i>et al.</i> , 2005
<i>ATG8e</i>	At2g45170	
<i>ATG8f</i>	At4g16520	
<i>ATG8g</i>	At3g60640	
<i>ATG8h</i>	At3g06420	
<i>ATG8i</i>	At3g15580	
<i>ATG5</i>	At5g17290	Inoue <i>et al.</i> , 2005 ; Thompson <i>et al.</i> , 2005
<i>ATG10</i>	At3g07525	Shin <i>et al.</i> , 2009 ; Philipps <i>et al.</i> , 2008
<i>ATG12a</i>	At1g54210	
<i>ATG12b</i>	At3g13970	Doelling <i>et al.</i> , 2002 ; Thompson <i>et al.</i> , 2005 ; Chung <i>et al.</i> , 2010

Tableau 1. Tableau présentant les homologues des gènes ATG chez Arabidopsis.
(Les références sont indiquées dans le tableau).

3. La machinerie moléculaire de l'autophagie

Les gènes de l'autophagie ont été découverts chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* au milieu des années 90 lors d'un crible génétique visant à trouver des mutants incapables de s'adapter et de survivre à la carence nutritionnelle ou étant déficients dans la dégradation de protéines cytosoliques (Tsukada & Ohsumi, 1993; Thumm *et al.*, 1994). Depuis, avec la découverte de nouveaux gènes d'autophagie (*ATG* ; *AuTophagy gene*), leur nombre a atteint 32 chez la levure. La plupart de ces gènes *ATG* sont essentiels à la formation de l'autophagosome et constituent le cœur de la machinerie moléculaire. Ce cœur peut être divisé en quatre groupes fonctionnels (Figure 4). Le complexe de régulation et le complexe PI3K sont importants dans l'étape d'initiation de formation de la membrane et les trois autres complexes interviennent dans l'élongation de cette membrane.

Des homologues de ces gènes *ATG* ont été identifiés chez les plantes. Le tableau 1 présente les homologues identifiés ou prédits chez *Arabidopsis thaliana*, les noms des gènes ainsi que les références des publications dans lesquels ces gènes ont été décrits.

- **Le complexe de régulation ATG1**

La protéine kinase ATG1 et les protéines ATG13, ATG17, ATG29 & ATG31 fonctionnent ensemble dans le même complexe (Figure 5 ; Nakatogawa *et al.*, 2009). La protéine kinase ATG1 joue un rôle prépondérant dans l'activation de l'autophagie en agissant en aval du complexe TOR (Target of Rapamycin) décrit plus loin. La phosphorylation d'ATG13 est dépendante de TOR et c'est son état de phosphorylation qui permet à ATG13 de s'associer ou non aux autres membres du complexe. En effet, l'inactivation de TOR conduit à la déphosphorylation d'ATG13, lui conférant une plus grande affinité pour ATG1 et ATG17, ce qui induit le processus d'autophagie. L'interaction d'ATG1 avec ATG13 et ATG17 permet l'augmentation de l'activité kinase d'ATG1, essentielle pour l'autophagie et fortement induite en réponse à la carence nutritionnelle chez la levure. Cependant, la cible de la kinase ATG1 est inconnue à ce jour.

Chez les plantes, 3 gènes ATG1 et 2 gènes ATG13 ont été identifiés par homologie de séquence chez *Arabidopsis*. Néanmoins, aucun mutant de plantes pour ces gènes n'a été publié jusqu'à présent.

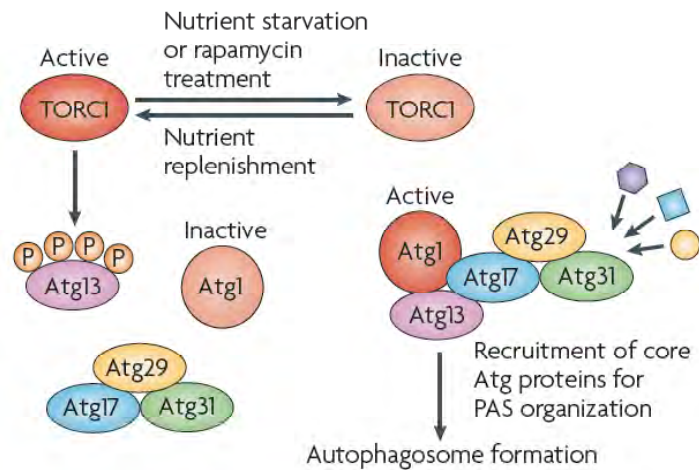


Figure 5. Le complexe de régulation ATG1.

Lorsque le complexe TOR (Target Of Rapamycin) est inhibé à la suite d'une limitation en nutriments ou un traitement à la rapamycine, la protéine ATG13 est déphosphorylée. Ceci permet l'association d'ATG1 avec ATG13, suivi de l'activation de l'activité kinase d'ATG1 et le recrutement des autres protéines sur la structure pré-autophagosomale (PAS) pour initier la formation de l'autophagosome. Ces évènements sont immédiatement reversés par la fourniture de nutriments (D'après Nakatogawa *et al.*, 2009).

- **Le complexe PI3K**

Chez la levure, VPS34 (Vacuolar Protein Sorting) est la seule phosphatidylinositol 3-kinase. Cette protéine peut former deux complexes : I et II. Le complexe I est composé de VPS34, VPS15, VPS30 (ATG6) et ATG14 alors que le complexe II comporte VPS38 à la place d'ATG14. Les complexes I et II sont respectivement localisés sur le PAS (Structure Pré-Autophagosomale) ou la membrane des endosomes suivant la présence spécifique d'ATG14 ou de VPS38 (Obara *et al.*, 2006; Nakatogawa *et al.*, 2009). Les complexes I et II ont des rôles respectivement dans l'autophagie ou dans la voie « Vacuolar Protein Sorting ». La voie appelée « Vacuolar Protein Sorting » permet le transport sélectif de protéines depuis le Golgi jusqu'à la vacuole *via* les endosomes. L'activité kinase de VPS34 est nécessaire à la génération de phosphatidylinositol 3-phosphate, lipide participant à la formation de l'autophagosome, au niveau du PAS (Suzuki & Ohsumi, 2007).

Seules les protéines ATG6 et VPS34 ont été identifiées chez les plantes.

- **Le complexe ATG9**

ATG9 est la seule protéine transmembranaire essentielle à l'autophagie. Cette protéine transite entre le PAS et la membrane du phagophore mais n'a jamais été retrouvée dans l'autophagosome. Comme les autres protéines du processus d'autophagie, elle est libérée et recyclée avant même que l'autophagosome ne soit clos (Reggiori *et al.*, 2004). Comme ATG9 est une protéine transmembranaire, son retrait ne se fait pas par simple dissociation de la membrane, mais nécessite l'intervention d'autres protéines : ATG2 et ATG18, situées à la périphérie de la membrane. ATG18 se lie au phosphatidylinositol-3-phosphate de la membrane. De plus, ATG1 facilite l'association d'ATG2 et d'ATG18 avec ATG9. La formation de ce complexe permet le recyclage continu d'ATG9 du phagophore en croissance avant qu'il ne devienne autophagosome (Kiel, 2010).

Ce complexe, comprenant les protéines ATG2, ATG9 et ATG18, est également impliqué dans l'autophagie chez *Arabidopsis*. En effet, les mutants *atg9-1*, *atg2* et les plantes contenant un RNAi dirigé contre *AtATG18a* sont incapables de former des autophagosomes (Hanaoka *et al.*, 2002 ; Xiong *et al.*, 2005 ; Inoue *et al.*, 2006).

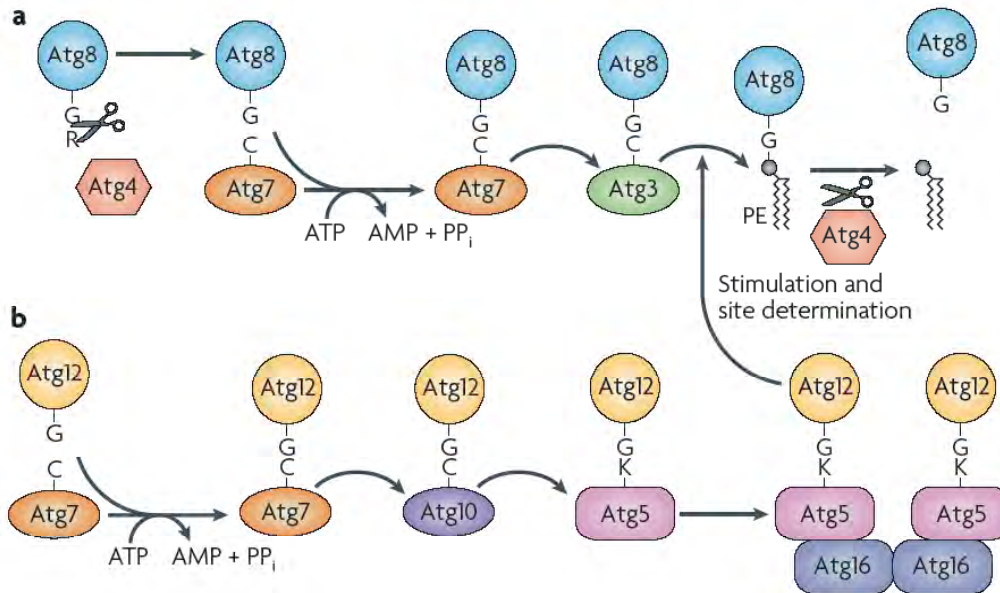


Figure 6. Les systèmes de conjugaison.

a. Le système de conjugaison d'ATG8. Tout d'abord, ATG4 clive le résidu arginine (R) situé dans la région carboxy-terminale exposant ainsi une glycine (G) en partie C-terminale. ATG8 est activée par ATG7 (une enzyme E1), transférée sur ATG3 (une enzyme E2) et éventuellement conjuguée à la phosphatidyléthanolamine (PE). ATG4 clive également le pont entre ATG8 et PE afin de libérer la protéine ATG8 de la membrane de l'autophagosome.

b. Le système de conjugaison d'ATG12. ATG12 est fixé sur le résidu lysine (K) d'ATG5 de façon similaire à la réaction de conjugaison d'ATG8, excepté le fait qu'ATG10 fonctionne comme une enzyme E2 dans ce système à la place d'ATG3. Le complexe ATG12-ATG5 interagit avec ATG16 et forme un oligomère. Le complexe ATG12-ATG5-ATG16 exerce la fonction d'une enzyme E3 sur la réaction de conjugaison d'ATG8 ; la réaction de transfert d'ATG8 depuis ATG3 sur la phosphatidyléthanolamine (PE) est stimulée par ce complexe (D'après Nakatogawa *et al.*, 2009).

- **Le système de conjugaison d'ATG8 à la phosphatidyléthanolamine**

La conjugaison de la protéine ATG8 à un lipide membranaire est comparable à un processus d'ubiquitinylation. L'ubiquitinylation est une modification post-traductionnelle nécessitant l'intervention successive de trois grandes classes d'enzymes appelées E1-, E2- et E3-ligases. Cette réaction permet *in fine* la fixation d'une ou de plusieurs protéines d'ubiquitine sur une ou plusieurs lysines servant d'accepteurs de la protéine substrat. Cette modification biochimique, appelée ubiquitinylation, permet à la protéine d'être adressée vers le protéasome pour y être dégradée. Dans le processus d'autophagie, la protéine ATG8 nouvellement synthétisée est clivée par la protéase à cystéine ATG4 au niveau de sa partie C-terminale (Kirisako *et al.*, 2000). La protéine ATG8 ainsi modifiée est ensuite activée lors d'une réaction nécessitant de l'ATP par ATG7 une enzyme comparable à une E1-ligase, qui forme un pont thioester entre le résidu glycine d'ATG8 et son résidu cystéine. ATG8 est ensuite transférée sur le résidu cystéine d'ATG3, une enzyme qui pourrait correspondre à la E2-ligase d'un système d'ubiquitinylation. Enfin, ATG8 est conjuguée à la phosphatidyléthanolamine (PE), un lipide de la membrane de l'autophagosome *via* la formation d'un pont amide entre le résidu glycine d'ATG8 et le groupe amine de la PE (Ichimura *et al.*, 2000 ; Yoshimoto *et al.*, 2004). ATG8 est ainsi ponté à la membrane du phagophore mais les ATG8 situées sur ce qui sera la membrane externe de l'autophagosome sont clivées avant la fermeture de celui-ci. Ainsi, la conjugaison ATG8-PE est un processus réversible puisque ATG4 est capable de libérer ATG8 de sa cible lipidique. Les protéines ATG8 ainsi libérées sont recyclées et réutilisées, permettant une progression efficace de l'autophagie (Figure 6a ; Nakatogawa *et al.*, 2009 ; Yang & Klionsky, 2009).

- **Le système de conjugaison d'ATG12**

Le système de conjugaison d'ATG12 fait également intervenir ATG7, qui active ATG12 puis la transfère sur le résidu cystéine de l'enzyme ATG10, comparable à une E2-ligase. ATG12 est ensuite conjuguée à ATG5 via la formation d'un pont isopeptide entre le résidu glycine situé en position C-terminale d'ATG12 et le résidu lysine d'ATG5 (Figure 6b ; Mizushima *et al.*, 1998; Nakatogawa *et al.*, 2009). L'analyse des mutants *atg5* et *atg12* a permis de montrer que la formation de ce conjugué est essentiel à la formation de l'autophagosome également chez *Arabidopsis* (Suzuki *et al.*, 2005). Les

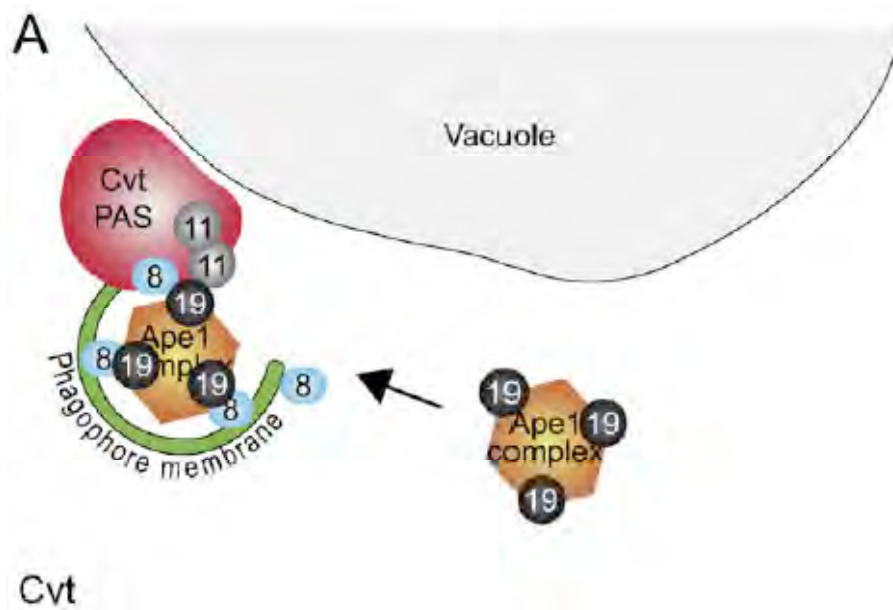


Figure 7. Vue mécanistique du « Cytosol to Vacuole Targeting pathway ».

ATG19 (19) est la protéine réceptrice de la voie CVT qui séquestre le complexe aminopeptidase 1 (Ape1 complex). ATG19 interagit avec ATG11 (11) au niveau de la structure pré-autophagosomale spécifique de cette voie CVT (Cvt PAS). L'interaction de la protéine ATG19 avec la protéine ATG8 (8) permet l'expansion de la membrane du phagophore (D'après Manjithaya *et al.*, 2010).

deux complexes de conjugaison assurent l'élongation de la membrane de l'autophagosome.

Il est important de noter qu'aucune des protéines impliquées dans la formation de l'autophagosome, exceptée ATG8, ne persiste sur la membrane de l'autophagosome. Elles sont toutes recyclées avant sa fermeture.

4. La sélectivité de l'autophagie

Initialement, l'autophagie était décrite comme un mécanisme de dégradation non ciblée. Mais, la découverte de protéines ATG spécifiquement requises pour la dégradation de certains organites a permis de définir l'autophagie comme un processus sélectif. Ainsi, viennent s'ajouter « au cœur de la machinerie moléculaire » des protéines ATG spécifiques à différentes formes d'autophagies ciblées comme la « CVT pathway », la mitophagie, la pexophagie, la ribophagie et la chlorophagie.

4.1. CVT pathway

Le CVT pathway signifie « Cytosol to Vacuole Targeting pathway ». Cette forme d'autophagie n'a été décrite que chez la levure. Dans des conditions nutritives optimales, *Saccharomyces cerevisiae* possède un précurseur de l'aminopeptidase 1 appelé prApe1. Ce précurseur forme des oligomères puis s'assemble en un large complexe appelé complexe CVT. Ce complexe protéique est reconnu par la protéine ATG19 puis séquestré par une vésicule à double membrane appelée vésicule CVT. Cette vésicule d'une taille moyenne de 150 nm de diamètre est transportée vers la vacuole où sa membrane externe fusionne avec celle de la vacuole, relarguant ainsi dans la lumière de la vacuole le corps CVT. Cette vésicule possède des similarités morphologiques avec l'autophagosome puisqu'elle possède une double membrane mais sa taille est bien inférieure à celui-ci (150 nm versus 400-900 nm). La formation de ces deux vésicules requiert les acteurs du cœur de la machinerie moléculaire de l'autophagie (Yu *et al.*, 2008). Les protéines ATG19 et ATG11 sont spécifiques de la voie CVT et sans doute cruciales pour la sélectivité de cette voie. ATG19 possède des domaines de liaison au

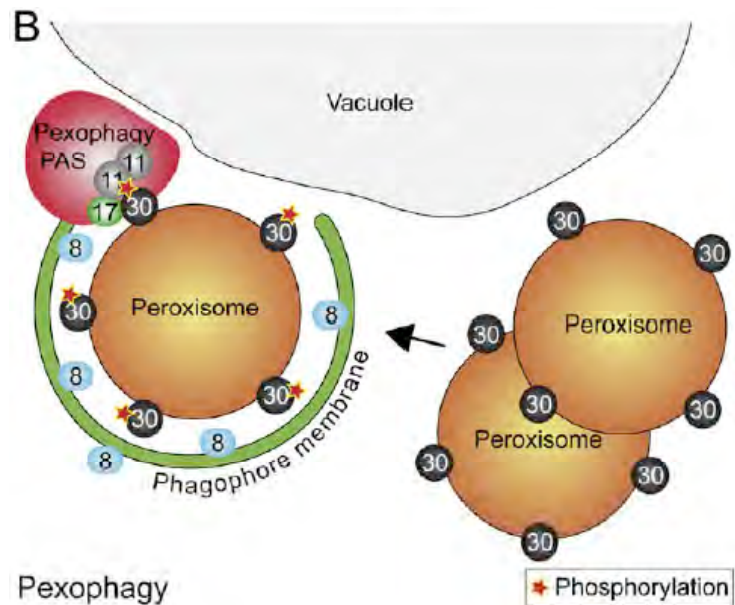


Figure 8. Vue mécanistique de la pexophagie.

ATG30 (30) est la protéine réceptrice pour la pexophagie. Cette protéine est présente sur la membrane du peroxysome et est phosphorylée (30★) durant le processus. La protéine ATG30 phosphorylée (30★) interagit ensuite avec les protéines adaptatrices ATG11 (11) et ATG17 (17) au niveau du site d'assemblage du phagophore (Pexophagy PAS) spécifique de la pexophagie. ATG30 est nécessaire pour la formation de la membrane du phagophore qui séquestre les peroxysomes lors de pexophagie (D'après Manjithaya *et al.*, 2010).

complexe CVT et à la protéine ATG8 (Noda *et al.*, 2010). Elle est la première protéine recrutée sur le complexe, avant ATG11, protéine capable d'interagir avec ATG1 et ATG9. Dans ce système, ATG19 représente une protéine marqueur, ATG8 est la protéine réceptrice et ATG11 la protéine adaptatrice (Figure 7 ; Manjithaya *et al.*, 2010)

Aucun homologue des protéines ATG19 et ATG11 n'a été identifié ni chez les végétaux ni chez les animaux, laissant supposer que cette voie est spécifique de la levure.

4.2. Pexophagie

Les peroxysomes sont des organites entourés par une membrane simple et ne contenant pas de matériel génétique. Ils interviennent dans la détoxification de la cellule par la dégradation des peroxydes, des acides gras à très longues chaînes et la synthèse d'acides gras poly-insaturés (Kraft *et al.*, 2009a). Les peroxymes des plantes sont également impliqués dans la photorespiration, la biosynthèse d'hormones et la défense contre les pathogènes. La balance entre leur biogenèse et leur dégradation est hautement régulée en fonction des changements environnementaux et/ou des conditions physiologiques (Sakai *et al.*, 2006). La dégradation du surplus de peroxysomes et des peroxysomes altérés est réalisée par une voie d'autophagie sélective de ces organites appelée pexophagie. Les travaux réalisés sur les levures méthylo-trophiques *Pichia pastoris* et *Hansenula polymorpha* ont permis de définir deux types de pexophagie : la micro-pexophagie et la macro-pexophagie (Manjithaya *et al.*, 2010). Lors de la macro-pexophagie, un peroxysome unique est séquestré par une double membrane qui, après fusion, formera une vésicule. Cette vésicule s'associe à la membrane vacuolaire et libère le peroxysome, préalablement englobé, à l'intérieur de celle-ci. Lors de la micro-pexophagie, les peroxysomes sont englobés par une Membrane Vacuolaire de Séquestration (VSM) et par un appareil spécifique de cette forme d'autophagie : le MIPA (MIcroPexophagy specific Apparatus) qui forme un « couvercle » au-dessus des VSMs enfermant les peroxysomes. ATG30 constitue la phosphoprotéine réceptrice des peroxysomes pour la pexophagie (Farre *et al.*, 2008). Cette protéine s'associe aux peroxysomes *via* une interaction avec les protéines PEX3 et PEX14 situées dans la membrane des peroxysomes (Farre *et al.*, 2008). La phosphorylation d'ATG30 présente sur la membrane des peroxysomes lui permet de s'associer aux protéines

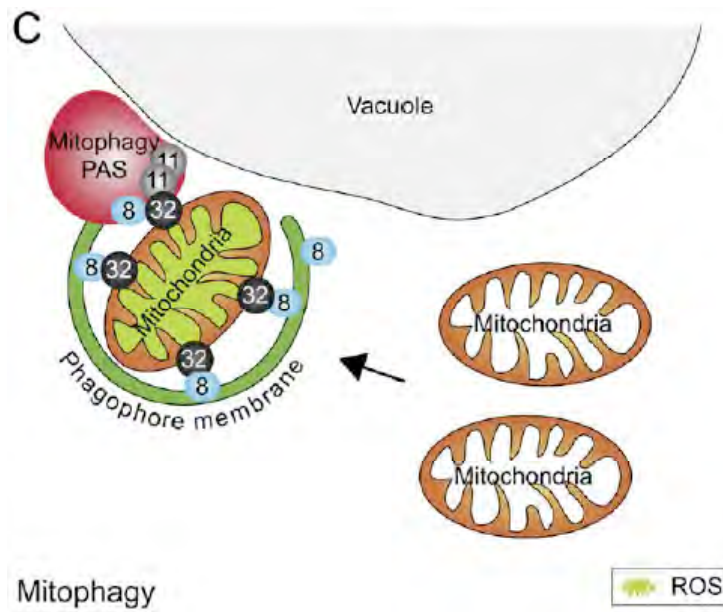


Figure 9. Vue mécanistique de la mitophagie.

Lors de la mitophagie, les mitochondries altérées notamment par les ROS sont sélectivement capturées pour une dégradation autophagique via le récepteur mitophagique ATG32 (32). ATG32 interagit avec ATG11 (11) au niveau du site d'assemblage du phagophore (PAS) et joue également un rôle dans l'expansion de la membrane du phagophore en interagissant avec ATG8 (8) (D'après Manjithaya *et al.*, 2010).

adaptatrices de la machinerie de l'autophagie ATG11 et ATG17 (Figure 8 ; Manjithaya *et al.*, 2010).

Jusqu'à ce jour, aucune forme de pexophagie n'a été identifiée chez les végétaux. Néanmoins, son existence est suspectée lorsque la surproduction de peroxyde d'hydrogène par la photosynthèse peut affecter les protéines du peroxydosome. Xiong *et al.* (2007a) a en effet montré que la présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) induit l'autophagie chez *Arabidopsis* et que les plantes transgéniques RNAi-AtATG18a sont plus sensibles aux ROS et accumulent plus de protéines oxydées, faute de permettre leur dégradation (Xiong *et al.*, 2007b).

4.3. Mitophagie

La mitochondrie est essentielle à la fourniture d'énergie pour la cellule, mais elle est aussi une source majeure de formes actives de l'oxygène pouvant provoquer des altérations cellulaires. Des mitochondries âgées, altérées ou en trop grand nombre peuvent alors constituer un facteur de risque pour la cellule. Leur limitation est primordiale afin de maintenir une homéostasie cellulaire optimale (Kanki & Klionsky, 2009 ; Kanki & Klionsky, 2010). Ce contrôle qualité est assuré par une voie spécifique de l'autophagie : la mitophagie. Lors des travaux de Kanki et d'Okamoto (Kanki & Klionsky, 2009 ; Okamoto *et al.*, 2009a ; Okamoto *et al.*, 2009b ; 2009c) *ATG32* et *ATG33* ont été décrits comme deux gènes spécifiques de la mitophagie et n'intervenant pas dans la macro-autophagie ni même dans les autres formes d'autophagie sélective. La protéine *ATG32* est située sur la membrane externe de la mitochondrie et se lie à *ATG11*. Cette liaison permet alors le recrutement spécifique de mitochondries vers la structure pré-autophagosomale. *ATG32* possède, comme la protéine de levure *ATG19* et la protéine de mammifère *P62*, un motif *WXXI* qui lui permet de se lier à *ATG8* (Figure 9 ; Okamoto *et al.*, 2009b; Manjithaya *et al.*, 2010).

A ce jour, aucun homologue d'*ATG32* et *ATG33* n'a été identifié chez les plantes, ce qui n'exclue pas l'existence d'une mitophagie chez les végétaux.

4.4. Ribophagie

Les ribosomes sont des complexes ribonucléoprotéiques dont la fonction est de traduire l'ARN en protéines. Ils représentent à peu près la moitié des protéines totales de la cellule. Ainsi, leur dégradation lors d'une situation de carence nutritionnelle peut représenter une source non négligeable d'acides aminés (Kraft *et al.*, 2009b).

Depuis la découverte de l'autophagie, il était accepté que la présence de ribosomes dans des autophagosomes, observée par microscopie électronique, était due à leur grand nombre dans la cellule et ainsi à la forte probabilité qu'ils se retrouvent dans la lumière des autophagosomes du fait de la non sélectivité de l'autophagie. Néanmoins, Kraft *et al.* (2008) a montré que les ribosomes étaient dégradés plus rapidement que les autres protéines cytosoliques et a suggéré une dégradation sélective de ces structures (Kraft & Peter, 2008). En effet, un criblage génétique avait montré que la dégradation de la sous-unité ribosomale 60S lors d'une carence dépendait de l'activité de la protéase Ubp3 et de son co-facteur Bre5. Ces deux protéines interagissent avec ATG19, protéine réceptrice de la CVT pathway (Baxter *et al.*, 2005). L'autophagie pourrait être responsable de la dégradation sélective des ribosomes.

Une publication récente suggère l'existence d'une ribophagie chez les végétaux. RNS2, une ribonucléase de la famille RNase T2 participerait à un mécanisme assimilé à de la ribophagie, ciblant les ribosomes pour recyclage dans des conditions de croissance optimale. En effet, les mutants pour cette protéine présentent une accumulation d'ARN dans la vacuole et une autophagie constitutive. Ces phénotypes ainsi que la localisation subcellulaire sur le réticulum endoplasmique et dans la vacuole de la protéine RNS2 incitent les auteurs à penser que la ribophagie existe également chez les plantes (Hillwig *et al.*, 2011 ; MacIntosh & Bassham, 2011).

4.5. Chlorophagie

Les plastes comme les chloroplastes sont des organites spécifiques des eucaryotes photosynthétiques. Les chloroplastes ont un rôle prépondérant dans la cellule végétale puisqu'ils sont le siège de la photosynthèse. Ils se distinguent des autres organites par leur plus grande taille, leur fort taux de production de ROS (Foyer & Noctor, 2003) et leur contenu considérable en azote (Reumann *et al.*, 2010). Lors de la

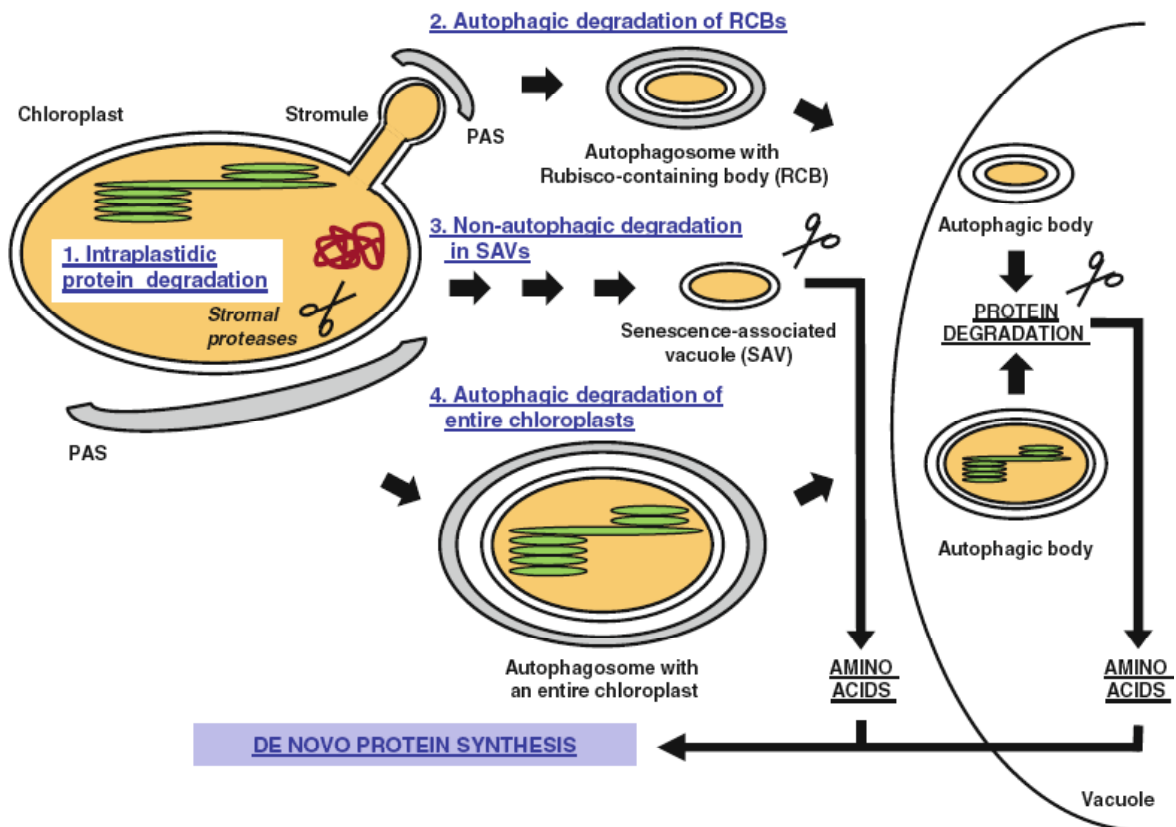


Figure 10. Voies de dégradation intra- et extra-plastidiales des protéines chloroplastiques.

Quatre voies différentes possibles pour la chlorophagie résumées de la façon suivante : (1) la dégradation intra-plastidiale par les protéases endogènes, (2) la dégradation extra-plastidiale de fractions du stroma par une voie dépendante de l'autophagie, (3) la dégradation extra-plastidiale de fractions du stroma par une voie indépendante de l'autophagie et (4) la dégradation du plaste entier par l'autophagie (D'après Reumann *et al.*, 2010).

sénescence et/ou de la carence nutritionnelle, les chloroplastes deviennent une source d'azote majeure pour le recyclage. Cet aspect sera développé plus tard dans cette introduction. Bien que la dégradation du chloroplaste soit primordiale au recyclage nutritionnel, les mécanismes impliqués sont peu connus. Jusqu'à présent, les études de la dégradation de cet organite et de la rubisco ont surtout été réalisées sur des cellules ou des feuilles en sénescence. De ces études découlent quatre voies différentes possibles résumées par Reuman *et al.* (2010 ; Figure 10) de la façon suivante : (1) la dégradation intra-plastidiale par les protéases endogènes, (2) **la dégradation extra-plastidiale de fractions du stroma par une voie dépendante de l'autophagie**, (3) la dégradation extra-plastidiale de fractions du stroma par une voie indépendante de l'autophagie et (4) **la dégradation du plaste entier par l'autophagie**.

Dans cette introduction, je ne détaillerai que les deux voies de dégradation du chloroplaste qui dépendent de l'autophagie ; celles que nous pourrions qualifier de chlorophagie.

En effet, il a été montré que le nombre de chloroplastes reste constant jusqu'à une phase de sénescence tardive, et ceci bien que les protéines du stroma soient dégradées dès la maturité de la feuille (Hortensteiner & Feller, 2002). Leur taille décroissante indique que le contenu protéique des chloroplastes peut être dégradé sans que la structure entière du chloroplaste ne disparaisse. Le chloroplaste serait en quelque sorte « vidé ». Des études menées sur les plantes supérieures et *Chlamydomonas* ont permis de montrer que la rubisco, enzyme foliaire majoritaire, peut être libérée du chloroplaste dans des vésicules puis transportée jusqu'à la vacuole (Guiamet *et al.*, 1999 ; Chiba *et al.*, 2003 ; Otegui *et al.*, 2005). Ces vésicules, identifiées par l'utilisation de lignées transgéniques exprimant des protéines du stroma ou encore la rubisco marquées avec la protéine fluorescente GFP, sont appelées les « Rubisco Containing Bodies » (RCB). Ishida *et al.* (Ishida *et al.*, 2008) a montré que le transport des RCB est dépendant de la voie de l'autophagie. En effet, chez les mutants d'autophagie, ces vésicules ne sont plus observées. Dans leur modèle établi en condition de carence nutritionnelle, un stromule bourgeonnerait du chloroplaste puis le bourgeon serait pris en charge par une membrane qui en fusionnant formerait une vésicule à double membrane, un RCB. Le transport de ce RCB vers la vacuole serait dépendant de la voie de l'autophagie. Enfin, ce corps serait dégradé à l'intérieur de la vacuole par les protéases résidentes.

Le chloroplaste est un gros organite dont la taille varie entre 5 et 10 μm alors que la taille d'un corps autophagique dans la vacuole avoisine 1,5 μm (Yoshimoto *et al.*, 2004). Comment l'autophagie pourrait-elle transporter et dégrader un chloroplaste entier? Wada *et al.* (2009) a montré que la formation des RCB participe au rétrécissement du chloroplaste et à sa conversion en gérontoplaste. D'une taille plus « raisonnable », le gérontoplaste pourrait alors être pris en charge par la macro-autophagie ou la micro-autophagie comme le montrent les figures ci-contre (Wittenbach *et al.*, 1982). Sur ces images de microscopie électronique prises sur des sections de cellules du mésophylle de blé, des chloroplastes apparaissent soit à l'intérieur de la vacuole ou englobés par des invaginations du tonoplaste.

4.6. Xénophagie

La xénophagie est un cas particulier d'autophagie du « non soi ». Elle correspond à une forme sélective qui dégrade spécifiquement les pathogènes intracellulaires comme les virus, les bactéries ou encore les parasites. La morphologie des vésicules englobant ces pathogènes est similaire aux autres formes d'autophagie et sa formation nécessite également les protéines du cœur de la machinerie moléculaire. La différence majeure observée est la grande taille des vésicules formées lors de ce processus (environ 10 μm) (Levine *et al.*, 2011). Pour l'instant, ce processus n'a été décrit que chez les animaux comme défense dans le cas d'infection par le bacille de la tuberculose par exemple.

5. Des méthodes pour l'étude du flux autophagique

Afin d'étudier les mécanismes d'autophagie, leur régulation, leur dynamique, plusieurs méthodes ont été développées ; ces méthodes n'apportant pas toujours les mêmes types d'information. Certaines permettent de quantifier les autophagosomes et d'autres de mesurer le flux autophagique. Le nombre d'autophagosomes est souvent, mais pas toujours, relié à l'activité autophagique de la cellule.

La méthode traditionnelle est la **microscopie électronique** qui permet l'observation des autophagosomes, reconnaissables à leurs doubles membranes. Cette

technique qui requiert une grande expertise n'est pas toujours disponible et se retrouve de plus en plus remplacée par des méthodes de microscopie confocale ou biochimique.

Fusionnée à la GFP (Green Fluorescent Protein), ATG8 représente un excellent marqueur des autophagosomes. Cette protéine est la seule à persister sur la membrane interne de l'autophagosome jusqu'à sa dégradation. Sous l'objectif du **microscope confocal**, les autophagosomes ainsi marqués sont représentés par de nombreux points fluorescents qui deviennent observables et globalement quantifiables. Leur vitesse de circulation dans la cellule, leur sens de navigation le long des microtubules peuvent également être évalués par ce biais. On trouve dans la littérature plusieurs observations réalisées avec des colorants des compartiments acides comme la monodansylcadaverine ou encore le LysoTracker. Néanmoins, les autophagosomes ne sont pas les seuls compartiments acides de la cellule et ces colorants ne leur sont pas spécifiques.

Chez les plantes, l'observation des corps autophagiques (constitués de la membrane interne de l'autophagosome et de son contenu) en **microscopie photonique** est facilitée par l'utilisation de drogues capable de bloquer leur dégradation dans la vacuole. La concanamycine A, le E-64d et la 3-MéthylAdénine (3-MA) sont les inhibiteurs les plus utilisés. Les corps autophagiques n'étant alors plus dégradés dans la vacuole, s'accumulent et deviennent observables dans les racines d'*Arabidopsis* en microscopie photonique. Le E-64d est un inhibiteur des protéases à cystéine. La concanamycine A quant à elle, inhibe les ATPases vacuolaires, conduisant à une augmentation du pH vacuolaire. Les protéases ne sont alors plus actives ; et les corps autophagiques, n'étant plus dégradés, s'accumulent dans ce compartiment et deviennent de ce fait plus facilement observables (Yoshimoto *et al.*, 2004).

La troisième méthode permettant de quantifier les autophagosomes est **biochimique**. La conversion de la forme libre d'ATG8 en sa forme ATG8-PE est détectée par immunoblot grâce à l'anticorps anti-ATG8. La forme conjuguée d'ATG8 migre plus vite que sa forme libre du fait de sa grande hydrophobicité. La forme lipidée est corrélée au nombre d'autophagosomes. En plus de donner une information sur le nombre d'autophagosomes, cette méthode biochimique, en étant basée sur le taux de renouvellement d'ATG8 permet de mesurer le flux autophagique. La forme « lipidée » est dégradée au sein de l'autophagosome (dans la vacuole).

Toutes ces méthodes ont été utilisées avantageusement pour caractériser les défauts des mutants d'autophagie et ainsi de révéler le rôle des gènes isolés.

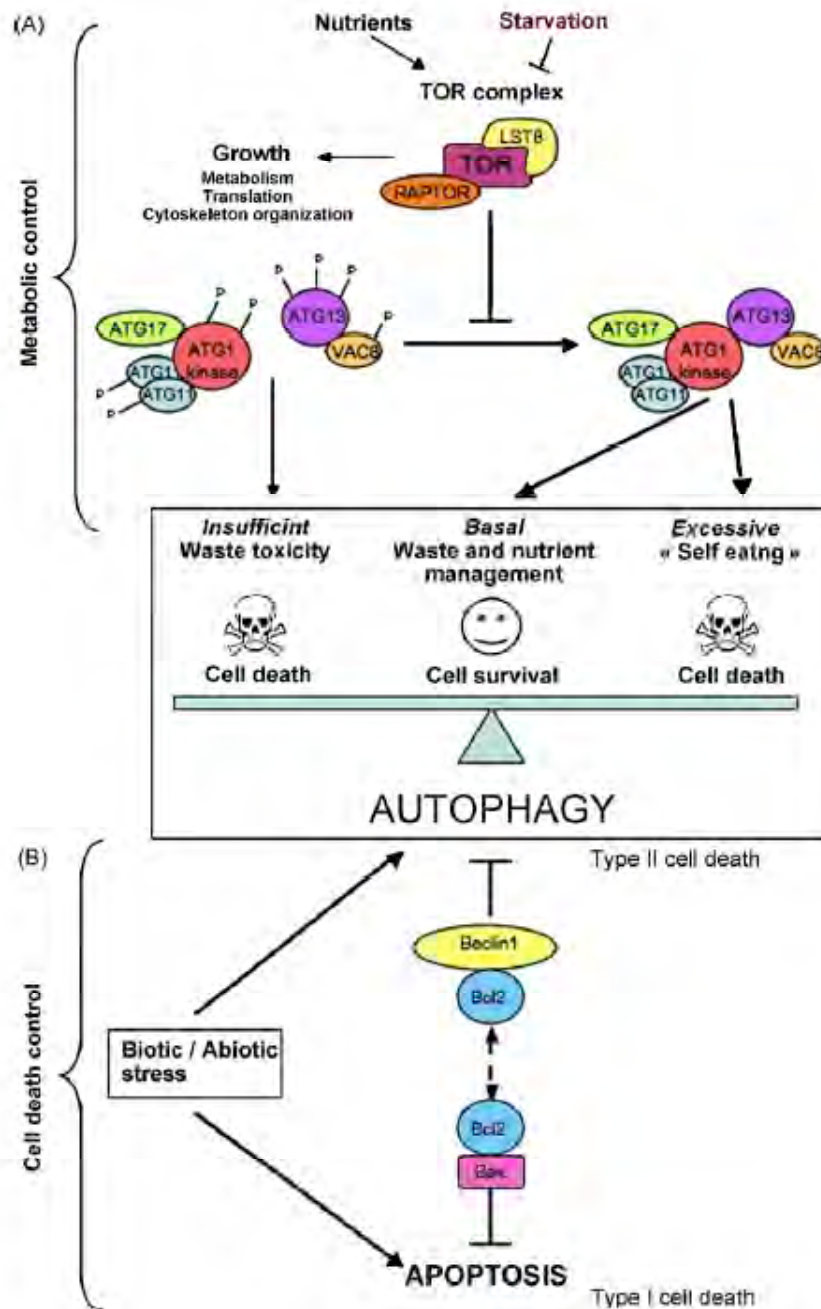


Figure 11. Des ajustements fins de l'autophagie déterminent la survie cellulaire ou à l'inverse la mort cellulaire. A un niveau basal, l'autophagie agit comme un mécanisme de survie cellulaire par le recyclage des déchets cellulaires et la production de substrats métaboliques lors de la carence nutritive. Une autophagie excessive conduit à une mort cellulaire par auto-digestion. Une autophagie insuffisante ou défectueuse conduit également à un processus de mort cellulaire par accumulation de protéines et organelles altérés.

(A) Les phosphorylations d'ATG1, d'ATG13 et d'autres protéines (ATG17, ATG11, VAC8) contrôlent l'induction de l'autophagie. TOR fonctionne en complexe avec Raptor et LST8 comme senseur du statut nutritionnel et contrôle le métabolisme et la croissance cellulaire. Dans des conditions de nutrition favorable, TOR inhibe l'autophagie en phosphorylant ATG1 et ATG13. Cette phosphorylation conduit à la dissociation du complexe ATG1/ATG13. En condition de carence nutritionnelle, TOR est inhibé. Les protéines ATG1 et ATG13 déphosphorylées s'associent en complexe, ce qui initie le processus d'autophagie.

(B) L'autophagie (mort cellulaire de type II) et l'apoptose (mort cellulaire de type I) sont contrôlées par la famille protéique Bcl2. L'association entre Bcl2 et Beclin1 conduit à l'inhibition de l'autophagie et l'induction de l'apoptose alors que l'association de Bcl2 avec Bax provoque le processus inverse (D'après Guiboileau *et al.*, 2010).

B. L'autophagie : rôles et régulations

Comment le fait de se « manger soi-même » peut-il être bénéfique pour l'organisme ?

1. Chez les animaux

Par définition, l'autophagie est un mécanisme de dégradation des constituants cellulaires qui permet leur recyclage ou leur élimination. Ce processus est utilisé par les cellules pour assurer la survie des organismes face à des conditions stressantes comme la limitation en nutriments, les conditions environnementales extrêmes, les infections ou bien simplement pour gérer les altérations liées au vieillissement. En contrôlant l'élimination des éléments toxiques ou encombrants pour la cellule, l'autophagie représente un mécanisme de longévité. Toutefois, et ce de façon paradoxale, l'autophagie, lorsqu'elle est dérégulée et exacerbée peut également constituer un mécanisme de mort cellulaire. Elle a d'ailleurs été nommée pendant longtemps mort cellulaire de type II en référence à l'apoptose proposée chez les animaux comme mort cellulaire de type I (Figure 11B ; Guiboileau *et al.*, 2010).

1.1. Autophagie et longévité

Active à un niveau basal, l'autophagie a un rôle de contrôle-qualité de la cellule. Par l'élimination des agrégats protéiques ou des protéines altérées et des organelles défectueux, elle détoxifie et désencombre la cellule et permet ainsi de maintenir une homéostasie cellulaire.

C'est pourquoi l'autophagie est induite en réponse aux stress susceptibles d'altérer le fonctionnement de la cellule comme le stress du réticulum endoplasmique qui provoque l'accumulation de protéines mal repliées, les stress oxydants d'origines diverses ou encore les altérations mitochondriales. L'autophagie est également un processus cellulaire qui permet de mobiliser des ressources nutritionnelles intracellulaires notamment en réponse aux carences nutritionnelles qu'elles soient azotées ou carbonées. Même s'ils contribuent tous à stimuler l'autophagie pour aider à

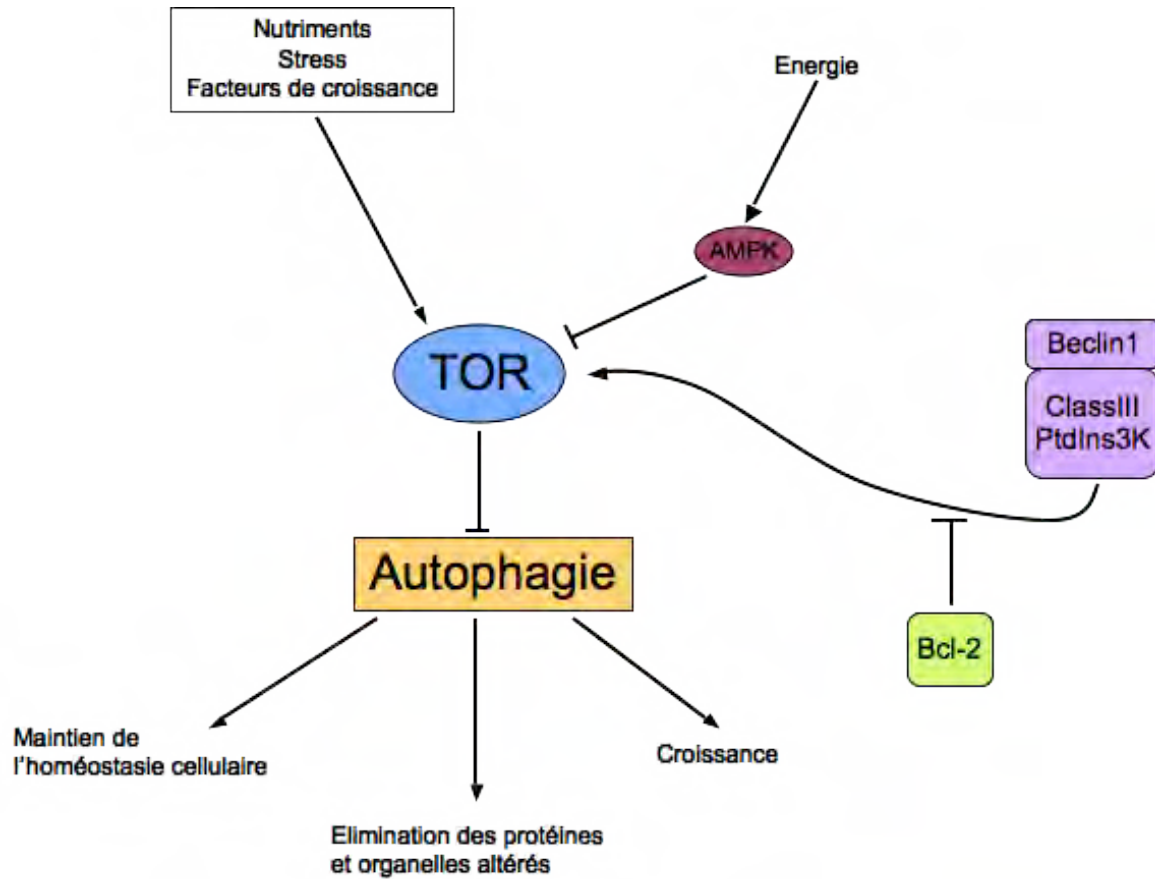


Figure 12. Cascades de signalisation impliquées dans la régulation de l'autophagie chez les mammifères.

L'autophagie est régulée par un réseau de signalisation complexe composé de signaux stimulateurs ou inhibiteurs. L'activation des récepteurs de facteurs de croissance provoque, via une cascade de signalisation, l'activation de TOR, conduisant à l'inhibition de l'autophagie. Les stress métaboliques, comme un fort rapport AMP/ATP résultant d'une diminution de l'énergie, causent l'activation d'AMPK, qui à son tour inactive TOR et active ainsi l'autophagie. La protéine anti-apoptotique Bcl-2 s'associe avec Beclin1 et inhibe la formation du complexe Beclin1-class III phosphatidylinositol 3-kinase, provoquant l'inhibition de l'autophagie. L'autophagie permet le maintien de l'homéostasie cellulaire, l'élimination des protéines et organelles altérés et a un rôle prépondérant dans la croissance (D'après Yang and Klionsky, 2010).

maintenir les cellules en bon fonctionnement, ces différents signaux font intervenir des voies de signalisation différentes (Kroemer *et al.*, 2010).

La limitation nutritionnelle est le facteur physiologique induisant l'autophagie le plus décrit. Pour la majorité des cultures cellulaires de mammifères, la carence en acides aminés induit l'autophagie dans les minutes qui suivent l'initiation du stress (Boya *et al.*, 2005). La dégradation des protéines qui en résulte permet à la cellule d'adapter son métabolisme et de répondre à ses besoins énergétiques. Ainsi, la stimulation de l'autophagie lors de la carence nutritionnelle qui fait suite à la naissance du souriceau, au moment où celui-ci doit fournir de l'énergie pour respirer, est essentielle à la survie de ce dernier. C'est alors grâce à la digestion partielle de son tissu cardiaque que son cœur continuera de battre (Kuma *et al.*, 2004).

Le mécanisme moléculaire par lequel le signal de carence nutritionnel est transmis jusqu'à la machinerie de l'autophagie a été découvert chez la levure. La protéine kinase TOR a été identifiée comme un élément essentiel dans la régulation de l'autophagie (Figure 12 ; Yang & Klionsky). TOR (Target Of Rapamycin) est une sérine/thréonine kinase très conservée qui appartient à la famille des PIKK (Phosphatidylinositol Kinase-related Kinase). Cette protéine a d'abord été décrite pour son rôle dans la sensibilité à la rapamycine puis de nombreuses études ont montré des rôles importants dans la régulation de la croissance cellulaire. En effet, elle régule la transcription, la traduction et le métabolisme en réponse à la disponibilité des nutriments et des facteurs de croissance (Wullschleger *et al.*, 2006). Active, TOR a un effet positif sur la croissance cellulaire et en parallèle un effet négatif sur l'autophagie qui n'est alors maintenue qu'à un état basal. TOR est donc un régulateur à l'interface de la croissance cellulaire et de l'autophagie. Lorsque, en situation de carence nutritionnelle, l'activité kinase de TOR est inhibée, ce qui réduit la croissance cellulaire et en même temps met la cellule sur un mode de recyclage nutritif qui assure sa survie, les cibles de TOR ne sont plus phosphorylées. ATG13, sous sa forme déphosphorylée, est alors capable de s'associer à la protéine ATG1 partiellement déphosphorylée. La formation de ce complexe conduit à l'initiation de l'autophagie. Une autre protéine kinase, AMPK (AMP-activated protein kinase) est aussi un acteur important dans la régulation de l'autophagie, surtout en réponse au stress énergétique. AMPK est activée lorsque l'énergie de la cellule est faible, ce qui correspond à un ratio AMP/ATP élevé. L'activation d'AMPK qui conduit à la phosphorylation et à l'activation de TSC1/TSC2

(Tuberous Sclerosis Complex), permet alors l'inhibition de TOR. Par ailleurs, AMPK peut également phosphoryler directement RAPTOR, un partenaire protéique essentiel à l'activité de TOR. Ainsi, par ce biais, AMPK participe également à une induction de l'autophagie.

En plus de ses rôles dans le recyclage nutritionnel ou l'élimination des déchets endogènes, l'autophagie est également connue pour aider la cellule à combattre d'autres facteurs dangereux que peuvent être les infections. Elle participe à l'immunité innée en permettant d'éliminer des pathogènes intracellulaires. Cette xénophagie limite leur réplication dans la cellule hôte (Klein *et al.*, 2010). L'autophagie intervient également dans les voies de signalisation contrôlant la réponse immunitaire ou encore l'inflammation. Les protéines de l'autophagie interagissent directement avec les molécules signales immunitaires. Inversement, les signaux immunitaires ou de l'inflammation sont capables d'inhiber ou de réprimer l'autophagie. Lors de son processus, elle participe aussi à l'immunité dite adaptative puisque la dégradation des protéines génère des antigènes qui seront ensuite présentés au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (Klein *et al.*, 2010).

1.2. L'autophagie, un mécanisme de mort cellulaire

L'autophagie a longtemps été considérée comme une forme de mort cellulaire de type II en comparaison à l'apoptose qui correspond à la mort cellulaire de type I. Ce type de mort cellulaire a été décrit historiquement sur des bases morphologiques cependant il est très difficile de distinguer s'il s'agit d'une mort avec l'autophagie ou d'une mort par l'autophagie. Ces deux formes de mort cellulaire possèdent des acteurs en commun qui permettent une régulation coordonnée des deux mécanismes. Bcl-2, une protéine anti-apoptotique inhibe l'autophagie lorsqu'elle est fixée à Beclin 1 (ATG6) et son absence au niveau de la mitochondrie induit l'apoptose. A l'inverse, lorsque Bcl-2 se fixe à Bax au niveau de la mitochondrie, l'apoptose est inhibée mais l'autophagie est induite (Figure 11B ; Guiboileau *et al.*, 2010).

1.3. Autophagie et maladies : rôle anti-tumoral et protecteur contre les maladies neurodégénératives.

De nombreuses recherches portent à présent sur l'étude de l'autophagie dans la prévention des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou encore dans les cancers. Des défauts dans le processus d'autophagie basale, c'est-à-dire dans l'élimination des agrégats protéiques ou des organelles défectueux, sont parfois la cause de ces maladies. Les maladies neurodégénératives se caractérisent souvent par l'accumulation et l'agrégation de protéines mutées ou toxiques dans le cytoplasme. Cette accumulation induit l'autophagie dans les premiers stades de la maladie mais rapidement, celle-ci n'est plus suffisante à l'élimination de ces protéines qui s'agrègent dans la cellule. L'autophagie a également un rôle anti-tumoral (Levine & Kroemer, 2008). Il a été montré que les patients atteints de cancers présentent souvent des altérations des gènes de l'autophagie. Par exemple, l'analyse d'échantillons de tissus d'un humain atteint d'un cancer du sein a montré une diminution de l'expression du gène *BECLIN 1*, l'homologue d'*ATG6* en comparaison à des individus sains (Liang *et al.*, 1999). Le rôle anti-tumoral de l'autophagie est suggéré par son implication dans la réduction de l'instabilité chromosomique, de la gestion du stress oxydatif, de la prolifération et de l'inflammation des cellules tumorales (Chen *et al.*, 2010).

2. Chez les plantes

2.1. Les rôles de l'autophagie et leurs signaux

Les mutants d'autophagie décrits jusqu'à présent dans la littérature chez les plantes sont tous, à l'exception d'*atg6*, capables de se développer jusqu'à produire des graines. Une analyse de ces mutants a permis de définir plusieurs rôles physiologiques de l'autophagie.

Tout d'abord, l'autophagie présente un rôle important dans la réponse aux stress abiotiques. Xiong *et al.* (2007b) a montré que l'exposition de plantules d'*Arabidopsis* à un stress oxydatif par traitement au H₂O₂ ou au méthylviologène conduit à une rapide et forte induction de l'autophagie visualisée par l'accumulation de corps autophagiques

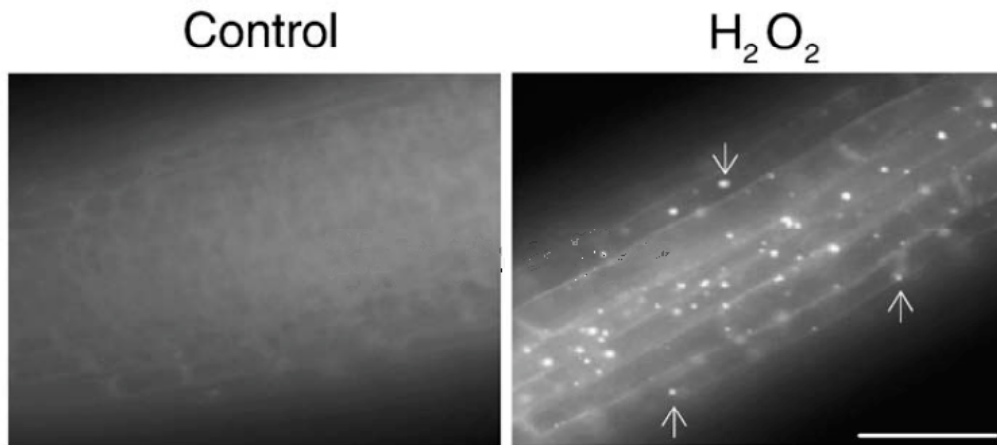


Figure 13. Activation de l'autophagie par le stress oxydatif dans des racines d'Arabidopsis.

Des plantules d'Arabidopsis âgées de sept jours sont incubées pendant six heures dans des conditions standards (control) ou en présence de 10mM de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) afin d'induire un stress oxydatif. L'incubation est suivie d'un traitement à la monodansylcadavérine pour colorer les autophagosomes. Les racines sont observées par microscopie à fluorescence. Les autophagosomes colorés sont visibles sous la forme de points clairs (flèches). Echelle = 50µm (D'après Xiong *et al.*, 2007).

dans les vacuoles (Figure 13 ; Xiong *et al.*, 2007b). Les Arabidopsis transgéniques AtATG18a-RNAi et le mutant de riz *Osatg10b* sont hypersensibles au stress oxydatif. La forte accumulation de protéines oxydées observée chez ces deux plantes semble être la cause de cette hypersensibilité. L'autophagie est ainsi un processus permettant de dégrader et d'éliminer rapidement les protéines à la suite de leur oxydation (Xiong *et al.*, 2007a ; Shin *et al.*, 2009).

En condition de stress salin et osmotique, le nombre d'autophagosomes, visualisés en microscopie confocale grâce à la fusion GFP-ATG8e et de corps autophagiques visualisés par un traitement à la monodansylcadavérine, est fortement augmenté. De plus, le gène *AtATG18a* est fortement induit. Les lignées transgéniques ATG18a-RNAi d'Arabidopsis se sont avérées plus sensibles au stress salin et à la sécheresse que le type sauvage suggérant ainsi un rôle de l'autophagie dans la tolérance à ces stress. Néanmoins, le rôle précis de l'autophagie dans la réponse aux stress salin et osmotique n'est pas encore élucidé (Liu *et al.*, 2009).

Bien que dans des conditions de stress abiotiques, l'autophagie soit considérée comme une réponse favorisant la survie cellulaire, elle est également connue pour contribuer aux processus de mort cellulaire programmée. Comme chez les animaux, la mort cellulaire a un rôle dans la morphogenèse des plantes et la mise en place de certains organes. La différenciation des trachéides du xylème lors du développement du système vasculaire se caractérise par la déposition d'une paroi secondaire et une mort cellulaire programmée lors de laquelle tous les constituants de la cellule sont éliminés. L'autophagie induite par l'activation de RabG3b intervient dans la différenciation des trachéides. RabG3b, protéine qui lie le GTP, a été montrée précédemment comme fortement induite en réponse aux brassinols, connus pour induire la formation des vaisseaux du xylème (Kwon *et al.*, 2010).

Par ailleurs, la mort cellulaire programmée chez les végétaux peut constituer un mécanisme de défense spécifique, connu sous le nom de réponse hypersensible (HR). Lorsqu'une plante est infectée par un agent pathogène, l'une des réponses mise en place par la plante est la HR. Elle se caractérise par la mort des cellules situées autour du site de l'infection créant un environnement défavorable à la dispersion du pathogène. Elle est généralement consécutive à la reconnaissance spécifique de l'agent pathogène par la plante *via* des interactions gènes d'Avirulence (Avr)-gènes de résistance (R). L'activation

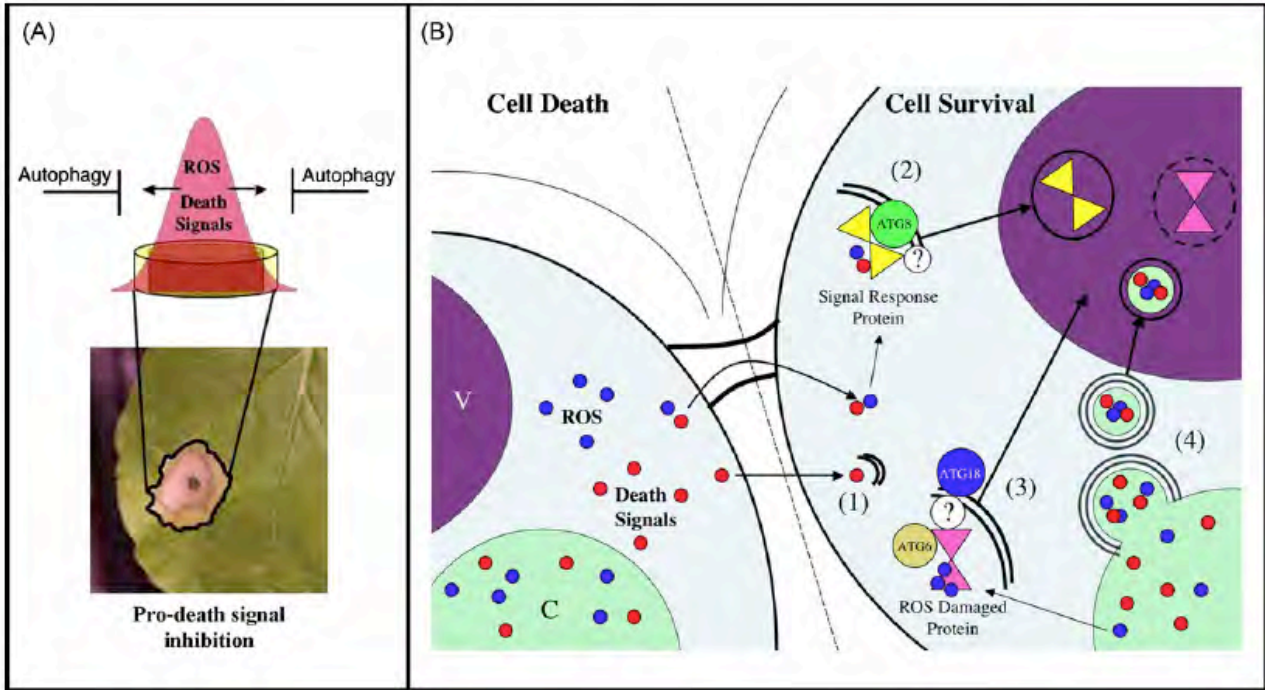


Figure 14. Modèle pour l'inhibition des signaux de mort cellulaire par l'autophagie pendant l'immunité déclenchée par des effecteurs d'origine pathogène.

(A) Modèle à l'échelle tissulaire. Lors de la réponse immunitaire déclenchée par des effecteurs, la reconnaissance du pathogène initie la libération de signaux de morts diffusibles. Ces signaux induisent la HR-PCD (mort cellulaire programmée associée à la réponse hypersensible) dans les cellules adjacentes, ce qui peut causer l'amplification du signal. L'autophagie cible les signaux de morts ou leurs sources pour dégradation. A un certain niveau, l'action de l'autophagie est suffisante pour éliminer les signaux de morts et prévenir leur propagation. L'induction de l'autophagie dans les tissus entourant le site de l'infection permet d'établir une bordure entre les tissus sains et les tissus mourants.

(B) Modèle à l'échelle cellulaire. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'autres signaux de morts potentiels, provenant d'une cellule subissant la HR-PCD, diffusent passivement au travers de l'apoplaste et l'espace extracellulaire ou via les plasmodesmes intracellulaires. La HR-PCD se propage de cellule en cellule jusqu'à ce qu'une cellule soit capable de séquestrer et de dégrader le signal avant que le niveau du signal déclenchant la HR-PCD soit atteint. L'autophagie permet la dégradation des signaux de morts soit (1) en ciblant directement les signaux de morts pour dégradation, soit (2) en ciblant pour dégradation les protéines qui traduisent et amplifient les signaux de morts, soit (3) en séquestrant et dégradant les protéines altérées par les ROS, ou soit (4) en ciblant les sources qui permettent l'amplification des signaux de morts comme le chloroplaste. La machinerie de l'autophagie pourrait cibler les signaux de mort par des interactions protéines-protéines. Les protéines candidates incluent ATG6, ATG8 et ATG18 (D'après Hayward *et al.*, 2009).

des voies de signalisation de défense suite à la reconnaissance du pathogène est localisée au site de perception du parasite et permet la mise en place des réponses de défense locales comme la HR. Cette réponse est possible grâce à la production de messagers hormonaux tels que l'acide salicylique ou encore de ROS qui seront véhiculés dans les tissus distants. L'acide salicylique (SA) et les ROS constituent des signaux mobiles véhiculés à la suite d'une infection locale vers les tissus sains y déclenchant la résistance systémique acquise par l'activation des protéines de résistance (PR) (Pieterse *et al.*, 2009). Des résultats contradictoires obtenus par différents groupes sur le rôle de l'autophagie dans la réponse immunitaire innée ont été présentés. Hofius *et al.* (2009) a montré que les lésions liées à la réponse hypersensible ne s'étendaient pas et se limitaient au site de l'infection chez les mutants d'autophagie. De façon paradoxale, Liu *et al.* (2005) a observé que la mort cellulaire liée à la HR ne se limite pas au site de l'infection et s'étend dans les tissus sains des mutants d'autophagie. Les observations de Liu ont été confirmées par Yoshimoto *et al.* (2009). Ces résultats suggèrent que les signaux de mort cellulaire produits dans les cellules où la reconnaissance du pathogène a eu lieu migrent continuellement vers les cellules adjacentes saines sans être atténués. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) générés naturellement au cours du développement des plantes sont produites de manière plus importante, rapide et localisée lors d'une attaque parasitaire. Ce phénomène est appelé « bouffée oxydante » et fait intervenir le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), son précurseur l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle (HO^{\cdot}) (Scandalios, 2005). L'autophagie pourrait intervenir à différents niveaux dans l'inhibition de la propagation des ROS et du SA, responsables de la mort cellulaire. Tout d'abord, un des rôles possibles de l'autophagie est de dégrader directement les ROS et le SA. La deuxième possibilité est qu'elle élimine les protéines qui traduisent et amplifient ces signaux. La troisième possibilité est qu'elle cible et dégrade les protéines oxydées. Enfin, la dernière possibilité est qu'elle dégrade le compartiment producteur de ROS que représente le chloroplaste (Figure 14 ; Hayward *et al.*, 2009).

En croisant les mutants d'autophagie avec des mutants déficients dans la synthèse d'acide salicylique comme *NahG* ou *sid2*, Kohki Yoshimoto (2009) est parvenu à supprimer la dispersion de la mort cellulaire initialement observée chez les mutants d'autophagie, confirmant le rôle de l'autophagie dans la suppression du signal de mort cellulaire.

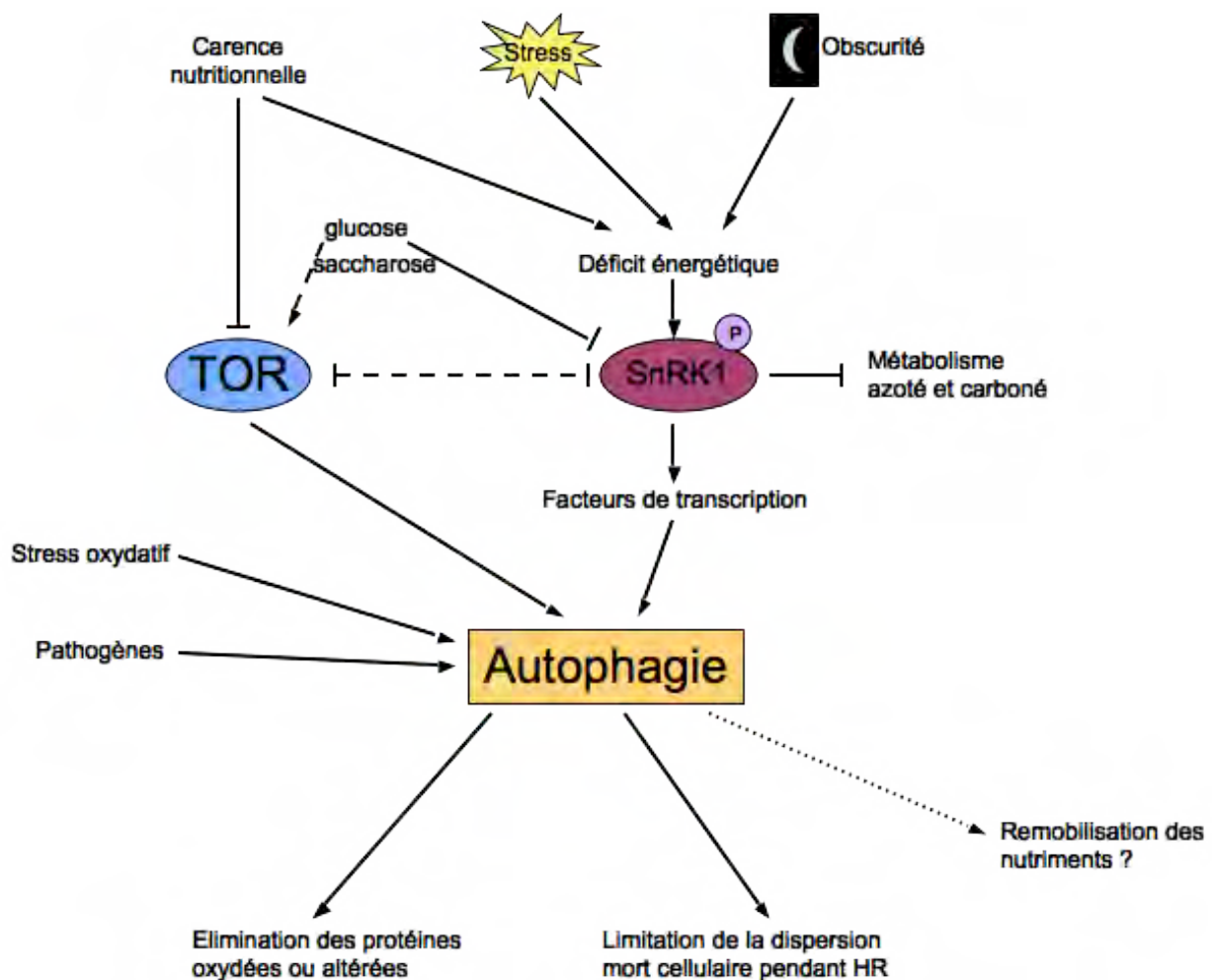


Figure 15. Cascades de signalisation impliquées dans la régulation de l'autophagie et rôles de l'autophagie chez Arabidopsis.

En plus de déclencher différentes réponses spécifiques aux stress, les différents types de stress convergent et génèrent des signaux de carence énergétique qui conduisent à l'activation des senseurs de SnRK1. A l'inverse, les sucres ont un effet répressif. La phosphorylation d'un résidu thréonine conservé est requis pour l'activité de SnRK1 mais le signal métabolique ultime pour l'activation de SnRK1 reste énigmatique. SnRK1 activée initie un programme de sauvegarde d'énergie par une reprogrammation transcriptionnelle qui cible de nombreux processus cellulaires. SnRK1 phosphoryle et régule certaines enzymes impliquées dans les métabolismes azoté et carboné. La carence nutritionnelle inhibe TOR et permet l'activation de l'autophagie. L'autophagie est également induite en réponse aux attaques de pathogènes et en réponse aux stress oxydatifs. Elle permet l'élimination des protéines oxydées ou altérées, limite la dispersion de la mort cellulaire lors de la HR et semble avoir un rôle dans le recyclage des nutriments (D'après Baena-Gonzalez *et al.*, 2008 ; Xiong *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2010).

En plus de leur sensibilité aux stress biotiques et abiotiques, il a été constaté que les mutants d'autophagie présentent naturellement une sénescence foliaire précoce et accélérée. Sensibles à la carence nutritionnelle, ces phénotypes sont exacerbés en condition de limitation en azote ou en carbone. L'expression de plusieurs gènes ATG est en effet induite lors de carences (Rose *et al.*, 2006 ; van der Graaff *et al.*, 2006). Les phénotypes de réponse à la carence sont aussi racinaires : lorsque ces mutants sont cultivés *in vitro* en situation de carence azotée, l'élongation de leurs racines est réduite par rapport au sauvage (Yoshimoto *et al.*, 2004).

La conjugaison de toutes ces observations suggère que l'autophagie est impliquée dans la remobilisation des nutriments en situation de carence et à la sénescence. Néanmoins, aucune évidence n'a été apportée jusqu'à ce jour.

2.2. Des régulateurs de l'autophagie : TOR et SnRK1

L'autophagie est induite en situation de stress notamment nutritionnel et ceci suggère une régulation de ce processus en fonction du statut nutritionnel de la plante. Les senseurs du statut nutritionnel chez les animaux et la levure sont les deux voies : TOR et AMPK (Figure 15).

Des régulateurs de l'autophagie connus chez la levure et les animaux ont été isolés chez les végétaux. En effet, la découverte d'un gène codant la protéine TOR chez *Arabidopsis* a permis d'en étudier la fonction. Comme chez les animaux et la levure, la protéine TOR semble être un régulateur central de la croissance cellulaire et du métabolisme en réponse aux changements environnementaux (Menand *et al.*, 2002; Deprout *et al.*, 2007). Néanmoins, l'état des connaissances sur la voie de signalisation de TOR chez les végétaux est beaucoup moins étendu. Ce décalage dans les connaissances peut s'expliquer par le fait que le complexe TOR est insensible à la rapamycine chez *Arabidopsis* et la plupart des plantes supérieures. Cette différence provient de l'incapacité de la protéine FKBP12 de se lier à la rapamycine, qui elle-même se lie au domaine FRB de TOR. Cette insensibilité à la rapamycine a rendu l'étude du complexe TOR plus difficile que chez les animaux et la levure. Néanmoins, l'expression hétérologue du gène de levure *ScFKBP12* chez *Arabidopsis* a permis d'induire sa sensibilité à la rapamycine (Sormani *et al.*, 2007).

Des homologues de la protéine TOR et des protéines impliquées dans la voie de signalisation ont été identifiés chez *Arabidopsis*. Son génome ne contient qu'un seul gène *TOR* contrairement à la levure qui en possède deux. La protéine TOR fonctionne en complexe multimérique et les partenaires du complexe TORC1 identifiés à ce jour sont LST8 et RAPTOR, laissant penser qu'il n'y a qu'un seul complexe chez *Arabidopsis*.

Comme chez les animaux et la levure, *AtTOR* est essentiel au développement d'*Arabidopsis*. La mutation de ce gène est en effet embryon létale. L'utilisation de plantes RNAi ou à l'inverse sur-expressives de *AtTOR*, a permis de montrer que ce gène est impliqué dans la croissance des plantes. Des sur-expresses d'*AtTOR* présentent une augmentation de la croissance racinaire et foliaire tandis que des plantes RNAi pour lesquels l'expression d'*AtTOR* est réduite montrent une diminution des croissances racinaires et foliaires. Les plantes des lignées RNAi de *AtTOR* sont alors plus petites, produisent moins de graines et présentent un phénotype de sénescence précoce. Une diminution de l'expression de *AtTOR* induit également une diminution de la traduction (Deprost *et al.*, 2007). *AtTOR* semble également intervenir dans la résistance des plantes aux stress car des plantes sur-exprimant *AtTOR* sont plus résistantes au stress osmotique que des plantes sauvages, et des plantes sous-exprimant *AtTOR* y sont plus sensibles (Deprost *et al.*, 2007).

Contrairement aux plantes, l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* est sensible à la rapamycine, faisant d'elle un bon modèle pour l'étude de la voie de signalisation de TOR chez les eucaryotes photosynthétiques (Crespo *et al.*, 2005 ; Diaz-Troya *et al.*, 2008). Ces organismes traités à la rapamycine, connue pour inhiber la voie de signalisation de TOR, présentent une augmentation de la vacuolisation qui est un effet de l'autophagie connu chez la levure (Crespo *et al.*, 2005). De plus, l'augmentation du niveau de protéine ATG8 suite au traitement à la rapamycine conduit les auteurs à suggérer la régulation de l'autophagie par TOR chez ces eucaryotes photosynthétiques unicellulaires (Esther Perez-Perez & Crespo, 2010; Esther Perez-Perez *et al.*, 2010). L'évidence de cette régulation chez les végétaux supérieurs restait toutefois à apporter. Récemment le groupe de Diane Bassham rapporte, l'observation d'un grand nombre d'autophagosomes marqués par la fusion GFP-ATG8 et de corps autophagiques en présence de concanamycine A chez des lignées transgéniques RNAi d'*AtTOR*, montrant

ainsi un rôle de TOR dans la régulation de l'autophagie chez *Arabidopsis thaliana* (Liu & Bassham, 2010).

Les protéines de la famille des SnRK1 (Snf1 (Sucrose non fermenting 1) Related protein Kinase) sont des homologues de la protéine SNF1 de levure et de la protéine AMPK chez les mammifères. Ces protéines jouent chez les plantes un rôle essentiel dans la réponse au stress notamment énergétique, aux sucres et à l'ABA (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007 ; Jossier *et al.*, 2009). Récemment, des analyses transcriptomiques ont révélé que la protéine KIN10, appartenant à la famille des SnRK1, est activée lors d'une carence en sucre et inhibée en présence de sucre (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007). KIN10 stimule la transcription de gènes du catabolisme de la paroi cellulaire, des lipides, du saccharose, des acides aminés, de l'amidon et des protéines, ce qui pourrait permettre de fournir à la cellule une source alternative d'énergie et de métabolites lors d'une carence. De manière intéressante, KIN10 active également l'expression des gènes d'autophagie comme *ATG8e* ainsi que des gènes impliqués dans la remobilisation de l'azote comme la *GDH* (*Glutamate DésHydrogénase*). A l'inverse, KIN10 réprime la transcription de gènes impliqués dans les processus coûteux en énergie tels que la biogenèse des ribosomes et l'anabolisme. Par ailleurs, l'expression des gènes *SnRK1* est fortement induite pendant les phases tardives de sénescence foliaire et des plantes sur-exprimant SnRK1 présentent une sénescence tardive (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007; Polge *et al.*, 2008).

Le mécanisme par lequel les protéines SnRK1 sont activées n'est pas complètement élucidé. Toutefois, Shen *et al.* (2009) a montré que les protéines kinases GRIK1 et GRIK2 d'*Arabidopsis*, qui ressemblent phylogénétiquement aux protéines kinases activatrices de SNF1 et AMPK, sont capables de phosphoryler et d'activer les protéines SnRK1. Le rôle possible des SnRK1 dans la régulation de l'autophagie reste pour l'instant à démontrer.

Enfin, du fait de leur possible interaction, les voies de signalisation de SnRK1 et de TOR pourraient agir de façon coordonnée sur la régulation de l'autophagie puisque de nombreuses interactions existent entre les sucres et les nutriments azotés. En effet, l'expression d'un grand nombre de gènes régulés par les sucres est affectée par l'azote et *vice versa*.

C. Les plantes face à la limitation en azote

Les plantes et les champignons sont les seuls organismes eucaryotes pluricellulaires capables d'assimiler l'azote inorganique présent sous forme de nitrate et/ou d'ammonium dans leur milieu naturel. Cependant, sous des conditions environnementales fluctuantes, la quantité et la disponibilité de l'azote dans les sols est souvent insuffisante pour assurer une croissance optimale, voire met en péril la survie des végétaux. Les plantes étant statiques, elles ont développé de nombreuses stratégies pour répondre et s'adapter aux variations de disponibilité en azote.

1. Réponse des plantes à la limitation en azote

La réponse des plantes à la limitation en azote se traduit au niveau foliaire par une réduction de la biomasse et de la taille, l'accumulation d'anthocyanes et l'induction précoce de la sénescence (Diaz *et al.*, 2006). Le jaunissement des feuilles qui caractérise la dégradation de la chlorophylle, traduit une diminution de l'activité photosynthétique et un début de modification des métabolismes chloroplastiques. L'accumulation des anthocyanes dans les feuilles, observable par le rougissement des feuilles des plantes carencées en azote, se retrouve également chez certaines espèces lors de la sénescence ou en situation de déséquilibre de la balance C/N (Matile *et al.*, 1992). La signification physiologique de cette accumulation reste inconnue (Peng *et al.*, 2008). Toutefois, il se pourrait que les anthocyanes soient des composés carbonés toxiques à haute dose pour la cellule, dont le stockage dans les vacuoles est nécessaire. L'accumulation des anthocyanes dans des feuilles sénescents précédant la dégradation de la chlorophylle, suggère à certains auteurs qu'elle pourrait avoir un rôle d'écran protecteur, protégeant l'appareil photosynthétique des effets néfastes de la lumière (Feild *et al.*, 2001 ; Hoch *et al.*, 2003).

Bien qu'en situation de limitation en azote, les plantes sont plus petites et produisent moins de biomasse. Leur indice de récolte semble inchangé et le remplissage de leurs graines peu modifié (Lemaitre *et al.*, 2008 ; Masclaux-Daubresse & Chardon, 2011). Ces observations montrent que les plantes s'adaptent afin de préserver la production de leurs semences.

Les modifications phénotypiques décrites ci-dessus sont la traduction macroscopique de modifications métaboliques plus fines. En situation de carence en azote, tous les composés carbonés comme les sucres libres, l'amidon et les anthocyanes s'accumulent (Diaz *et al.*, 2006 ; Lemaitre *et al.*, 2008). Cette accumulation de carbone est parallèle à la diminution de la synthèse des acides aminés qui est ralentie faute d'azote disponible. Liées à ce déficit d'assimilation d'azote inorganique, des études suggèrent qu'un recyclage de l'azote organique est favorisé afin de maintenir les régulations cellulaires et l'activité métabolique. En effet, bien que la limitation en azote n'affecte pas les concentrations en protéines totales, l'augmentation des activités protéasiques et l'expression des gènes impliqués dans la dégradation des protéines a été observée. L'induction de l'expression des enzymes de remobilisation de l'azote a également été observée. De façon intéressante, il a été montré que les plantes remobilisent plus leur azote vers le grain en situation limitante en azote qu'en situation pléthorique (Diaz *et al.*, 2008 ; Lemaitre *et al.*, 2008 ; Masclaux-Daubresse & Chardon, 2011). Plus de 68% de l'azote initialement contenu dans la rosette d'une plante carencée est remobilisé vers le grain, alors que ce pourcentage (36%) n'est que de moitié pour la même plante en situation de fort azote (Lemaitre *et al.*, 2008). La remobilisation des nutriments est une étape clef du métabolisme lié à la sénescence foliaire. De nombreuses études de transcriptomique et de physiologie montrent en effet que les gènes les plus induits lors de la sénescence sont impliqués dans le catabolisme et le transport des nutriments.

Les produits générés par la dégradation des macromolécules lorsque la feuille vieillit ou lorsque la plante est en difficulté face à une carence nutritionnelle sont essentiels à la croissance des nouveaux organes de la plante et à la production de graines.

2. Processus de recyclage et mobilisation de l'azote

2.1. Les sources d'azote pour la remobilisation

Le chloroplaste représente la source d'azote majoritaire pour la remobilisation puisqu'il contient 75-80% de l'azote foliaire total et qu'il sera dégradé en premier au cours de la sénescence foliaire (Makino & Osmond, 1991). De plus, 70% des protéines de la feuille sont localisées dans cet organite et la rubisco représente à elle seule 50% des protéines solubles foliaires (Mae *et al.*, 1983).

Les apoprotéines majeures des antennes collectrices du photosystème II nommé LHCP II (Light Harvesting Complex Protein II) représentent également une ressource en azote importante (Matile *et al.*, 1992). Cette antenne périphérique renferme la moitié de la chlorophylle a et le tiers des protéines du thylacoïde.

Chez certaines espèces, l'azote peut également être stocké de façon transitoire sous forme de protéines de stockage appelées VSP (Vegetative Storage Protein). Ces protéines peuvent s'accumuler à des concentrations très élevées comme chez le soja où elles représentent jusqu'à 50% des protéines solubles des feuilles lorsque l'ablation des gousses supprime le puits d'azote qui commande leur remobilisation (Ourry *et al.*, 2001). Chez *Arabidopsis thaliana*, où il existe deux gènes codant des VSP, ces protéines ne sont pas spécifiques des feuilles et sont préférentiellement exprimées dans les organes reproducteurs (Utsugi *et al.*, 1998).

Les ribosomes représentent également une part importante de l'azote protéique et nucléique.

2.2. Protéolyse et dégradation des protéines chloroplastiques

La dégradation des protéines chloroplastiques est assurée par une grande variété de protéases qui agissent au sein de l'organite intact. Due à l'origine endosymbiotique du chloroplaste, il n'est pas étonnant de constater que la plupart des protéases chloroplastiques décrites se rapportent à des enzymes bactériennes (Estelle, 2001). Ces protéases plastidiales peuvent être réparties en trois grandes familles : (1) la famille des FtsH, des métalloprotéases dépendantes de l'ATP, (2) la famille des endopeptidases à

sérine Deg/HtrA dépendante de l'ATP et (3) la famille des Clp (Olinares *et al.*, 2011). L'hydrolyse complète des protéines en acides aminés est dépendante de l'action des endoprotéases et des exoprotéases (Brouquisse *et al.*, 2001). La dégradation d'un substrat peut parfois faire intervenir plusieurs protéases qui agissent en série. La dégradation de la protéine D1 suite à son altération par des espèces réactives de l'oxygène lors de la photoinhibition nécessite la coopération des systèmes FtsH et Deg (Estelle, 2001 ; Kapri-Pardes *et al.*, 2007 ; Martinez *et al.*, 2008). Les protéases Deg sont situées pour certaines dans le stroma du chloroplaste et pour d'autres dans sa lumière. Les membres de la famille des Clp sont localisés dans le stroma et s'associent parfois aux membranes du chloroplaste, en particulier les protéines ayant des fonctions de chaperones. Ces chaperones permettent de reconnaître des substrats spécifiques et de les envoyer au cœur protéolytique pour les dégrader (Olinares *et al.*, 2011).

La dégradation de la rubisco, enzyme dominante du chloroplaste a fait l'objet de nombreuses études (Miyadai *et al.*, 1990 ; Yoshida & Minamikawa, 1996 ; Ishida *et al.*, 1998 ; Nakano *et al.*, 2006). Néanmoins, son processus de dégradation reste mal connu. Les premières phases de dégradation de la rubisco nécessitent l'intervention d'espèces réactives de l'oxygène. Sous l'action de ces ROS, la grande sous-unité de la rubisco est clivée en fragments de 37 kDa et 16 kDa (Ishida *et al.*, 1997). Un traitement *in vitro* de la rubisco par les espèces réactives de l'oxygène provoque des modifications qui permettent à la rubisco de devenir un substrat des protéases du stroma (Houtz & Portis, 2003). Par ailleurs, la glycation, formation d'une liaison covalente entre le groupement carbonyle d'une molécule de sucre et un groupe aminé de la protéine, augmenterait la susceptibilité de la rubisco pour la dégradation par protéolyse (Yamauchi *et al.*, 2002). Une protéase à aspartate CND41 localisée dans le chloroplaste sous sa forme d'apoenzyme pourrait participer à la dégradation de la rubisco. Toutefois, des études *in vitro* ont montré que l'activité protéolytique de cette enzyme, dont la cible préférentielle serait la rubisco, ne serait activée qu'à pH acide (Kato *et al.*, 2004).

Bien que la dégradation intra-plastidiale des protéines est supportée par la présence de nombreuses protéases dans le chloroplaste, la plus grande activité protéasique réside dans la vacuole suggérant qu'une part importante du processus de protéolyse se déroule dans ce compartiment (Martinez *et al.*, 2008). La vacuole pourrait être le compartiment final de la protéolyse. Cette hypothèse est supportée par le fait que la plupart des enzymes protéolytiques induites à la sénescence sont des protéases à

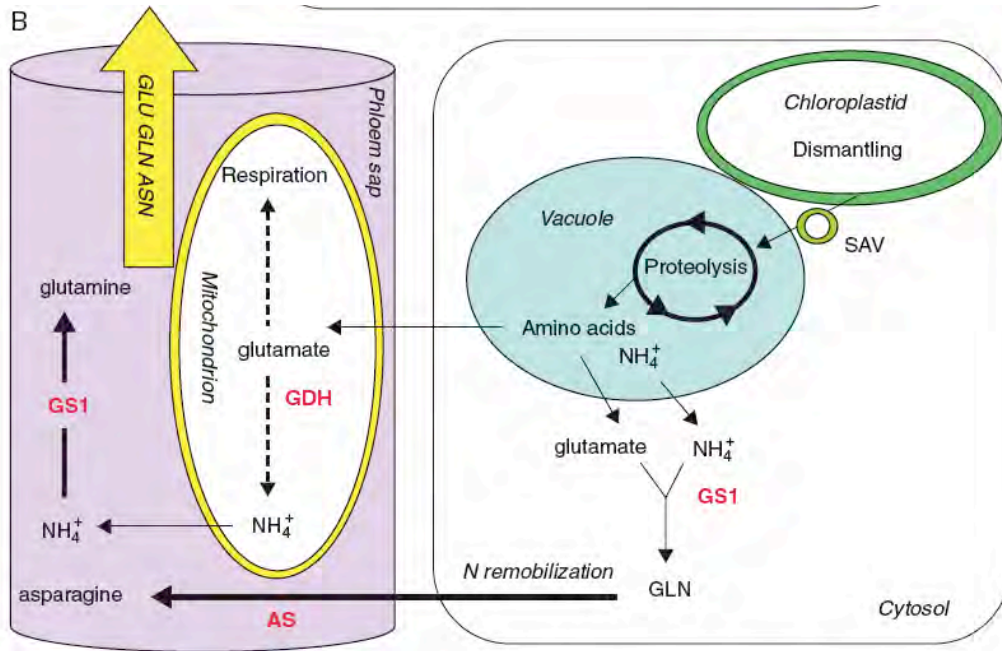


Figure 16. Représentation schématique des enzymes clés impliquées dans le recyclage de l'azote dans une feuille sénescente.

Les évènements associés à la sénescence incluent la dégradation du chloroplaste et la translocation des protéines vers la vacuole. Le recyclage des acides aminés a lieu dans les mitochondries et le cytosol. La glutamate déshydrogénase (GDH), la glutamine synthétase 1 (GS1) et l'asparagine synthétase (AS) sont les enzymes majeures impliquées dans la synthèse de glutamine, du glutamate et de l'asparagine (D'après Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010).

cystéine vacuolaires (Hensel *et al.*, 1993 ; Smart *et al.*, 1995). Ce constat impliquerait que les produits de dégradation générés à l'intérieur du chloroplaste soient transportés jusqu'à la vacuole. Pour le transport des protéines chloroplastiques vers la vacuole, deux routes possibles ont été proposées : les SAVs (Senescence Associated Vacuole) ou le cheminement *via* le processus vacuolaire de la macro-autophagie.

Les SAVs sont de petites vacuoles présentes dans la vacuole centrale des feuilles sénescentes (Otegui *et al.*, 2005). Elles ont une lumière acide favorable à l'activité des protéases à cystéine, contiennent des protéines chloroplastiques et sont délimitées d'une membrane contenant des H⁺-pyrophosphatases vacuolaires (Martinez *et al.*, 2008). Ces petites vacuoles présentent une forte activité protéolytique et il a été montré qu'elles contiennent l'une des protéases associées à la sénescence les plus connues : SAG12 (Otegui *et al.*, 2005). Du fait de leur forte activité protéolytique et de leur contenu en protéines chloroplastiques, les SAVs sont un site favorable à la dégradation des protéines chloroplastiques.

Ainsi, bien qu'il semble que la dégradation de la rubisco commence dans le chloroplaste, le mécanisme complet reste inconnu. L'autophagie pourrait participer à la suite de sa dégradation et à son transport jusqu'à la vacuole. Chiba a montré la présence de « Rubisco Containing Bodies » (RCBs) dans des feuilles sénescentes (Chiba *et al.*, 2003). Ces corps sphériques contenant de la rubisco ainsi que d'autres protéines du stroma chloroplastique, semblent ne pouvoir être formés que lorsque le cœur de la machinerie autophagique est fonctionnel. Ainsi, la présence de RCB dépendrait du processus d'autophagie (Ishida *et al.*, 2008).

2.3. Les enzymes impliquées dans la remobilisation

Lorsque la feuille sénescence sous l'effet de la limitation en azote, les gènes codant les enzymes impliquées dans la remobilisation sont induits (Buchanan-Wollaston, 1997 ; Figure 16 ; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). L'activité des enzymes impliquées dans l'assimilation de l'azote comme la nitrate réductase diminue alors que l'activité des glutamine synthétase cytosoliques et des glutamate déshydrogénase, enzymes participant à la remobilisation augmente (Lemaitre *et al.*, 2008).

La glutamine et l'asparagine sont décrits comme les acides aminés majoritairement transportés dans les vaisseaux du phloème (Feller & Fischer, 1994;

Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008). La dégradation des protéines entraînant la libération d'acides aminés, leur export vers les organes puits, nécessiterait ainsi une néosynthèse d'asparagine et de glutamate. Les acides aminés provenant de la dégradation des protéines sont également catabolisés en squelettes carbonés et en ammonium *via* des réactions de transamination et de désamination (Buchanan-Wollaston, 1997; Masclaux *et al.*, 2001). La glutamate déshydrogénase (GDH) mitochondriale permet la transformation du glutamate en α -cétoglutarate avec libération d'ammonium. L' α -cétoglutarate peut alors servir de squelette carboné pour la synthèse des sucres. De la même manière, le shunt du GABA permettrait de fournir du succinate au cycle de Krebs et libérerait de l'ammonium. L'ammonium ainsi libéré serait réassimilé en convertissant le glutamate en glutamine grâce aux isoformes cytosoliques de la glutamine synthétase (GS1) induites au cours de la sénescence. L'isoforme 1 de l'asparagine synthétase, enzyme à l'origine de la synthèse d'asparagine, pourrait elle aussi participer à la remobilisation de l'azote puisque les gènes codant cette protéine sont également induits au cours de la sénescence (Lam *et al.*, 2003; Begona Herrera-Rodriguez *et al.*, 2006); Laure Gaufichon, 2006-2009).

D. Quels rôles pour l'autophagie en réponse à une carence et au cours du développement ?

La découverte d'homologues des gènes d'autophagie chez les plantes puis les recherches menées chez les mutants d'autophagie par les groupes de Diane Bassham, de Richard Vierstra et d'Yoshinori Oshumi (Kohki Yoshimoto) ont permis de confirmer l'existence d'un processus de macro-autophagie fonctionnel chez les végétaux.

Les mutants d'autophagie décrits dans la littérature, à savoir *atg7-1* (Doelling *et al.*, 2002), *atg9-1* (Hanaoka *et al.*, 2002), *atg4a4b-1* (Yoshimoto *et al.*, 2004), *atg5-1* (Thompson *et al.*, 2005), *atg10-1* (Phillips *et al.*, 2008), *atg2* (Yoshimoto *et al.*, 2009) et la plante transgénique RNAi-ATG18a (Xiong *et al.*, 2005) sont tous déficients dans le processus d'autophagie. Toutefois, toutes ces plantes mutantes sont capables de se développer jusqu'à la production de graines en condition normale de nutrition.



Figure 17. Phénotype de sénescence précoce des mutants d'autophagie sous des conditions de nutrition riche.

Le sauvage et les mutants d'*Arabidopsis atg2* et *atg5* ont été cultivés sur de la vermiculite à 22°C, en jours longs et ont reçu une solution nutritive standard pendant six semaines (D'après Yoshimoto *et al.*, 2009).

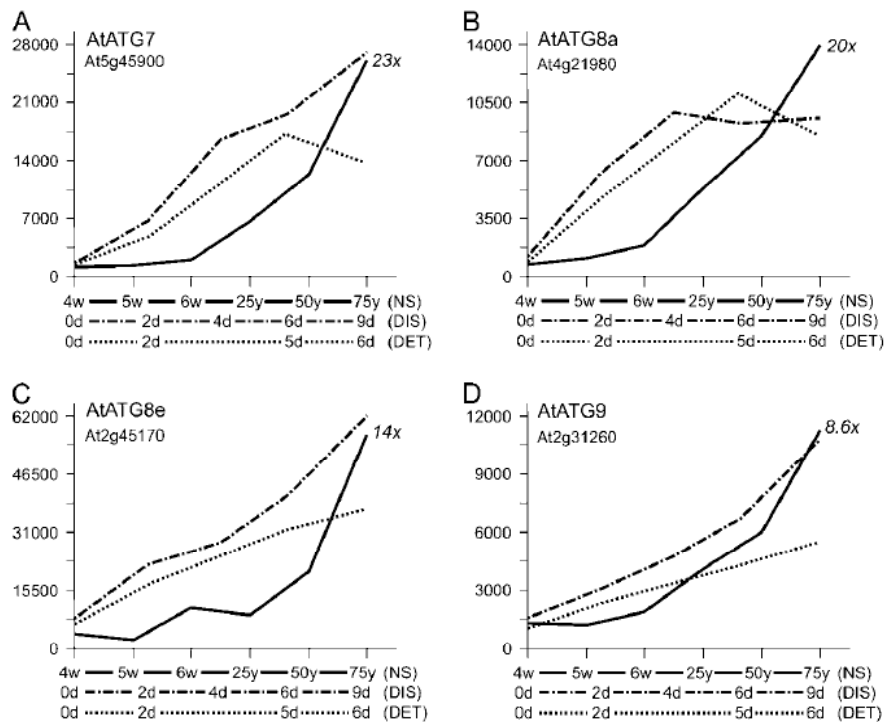


Figure 18. Le profil d'expression de gènes associés à l'autophagie en fonction de différents traitements induisant la sénescence sont présentés.

NS correspond à la sénescence foliaire développementale, DIS correspond à l'ombrage individuel des feuilles encore attachées sur la plante et DET correspond aux feuilles détachées et incubées à l'obscurité. L'échelle des temps n'est pas linéaire et est différente pour chaque traitement. Pour le traitement « NS », le rapport entre le dernier point d'échantillonnage, moment où 75% de la plante est jaune, et l'échantillon de référence à 4 semaines (4w) est présenté. Pour les deux autres traitements, l'échelle des abscisses est en jours (d) (D'après Van der Graaff *et al.*, 2006).

Les mutants d'autophagie présentent un phénotype de sénescence précoce et accélérée (Figure 17 ; Yoshimoto *et al.*, 2009). Ce phénotype est d'autant plus drastique que les plantes sont cultivées en situation de limitation nutritionnelle sévère et notamment en situation de limitation azotée. Le jaunissement des feuilles, caractéristique macroscopique de la sénescence, se produit en premier lieu sur les vieilles feuilles puis progresse successivement à l'ensemble de la rosette.

L'expression de plusieurs gènes *ATG* est régulée au cours de la sénescence mais aussi par la carence carbonée ou azotée (Wingler *et al.*, 2009). A la suite d'une carence en sucre, les gènes *AtATG3*, *AtATG4a*, *AtATG4b*, *AtATG7* et *AtATG8a-AtATG8i* sont rapidement et fortement induits (Rose *et al.*, 2006). L'étude transcriptomique menée sur des feuilles ayant subi des traitements induisant la sénescence montre que 19 des 21 gènes d'autophagie présents sur les puces sont induits (van der Graaff *et al.*, 2006). Les gènes *AtATG7*, *AtATG8a*, *AtATG8e* et *ATG9* sont les plus fortement induits, aussi bien au cours de la sénescence développementale que de la sénescence induite (Figure 18 ; van der Graaff *et al.*, 2006). La carence azotée induit également de nombreux gènes de l'autophagie chez le maïs (Chung *et al.*, 2009). L'augmentation de l'expression des gènes *ATG* en condition de carence nutritionnelle se traduit ensuite par une induction du flux autophagique. En effet, de nombreux autophagosomes sont observés dans les cellules de racines d'*Arabidopsis* ayant subi une carence en azote (Yoshimoto *et al.*, 2004).

Récemment, des travaux menés par Ishida *et al.* (Ishida *et al.*, 2008) montrent que le transport de rubisco et de protéines du stroma chloroplastique dans des « Rubisco containing bodies » (RCB) vers la vacuole n'est plus observé chez les mutants d'autophagie. Suggérant que le processus soit nécessaire à la formation des RCB et à leur transport, le modèle (Figure 19 ; Ishida *et al.*, 2008) propose qu'un stromule bourgeonnerait du chloroplaste et serait pris en charge et englobé par une membrane autophagique conduisant à la formation d'un RCB. Ce RCB serait alors véhiculé jusqu'à la vacuole par une voie dépendante des acteurs de l'autophagie. Ces observations suggèrent ainsi que l'autophagie pourrait participer à la remobilisation de l'azote chloroplastique.

Mon travail de thèse s'inscrit dans ce contexte et a pour objectif d'étudier l'implication de l'autophagie dans le recyclage nutritionnel chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Cette étude a été menée par des approches de physiologie de la

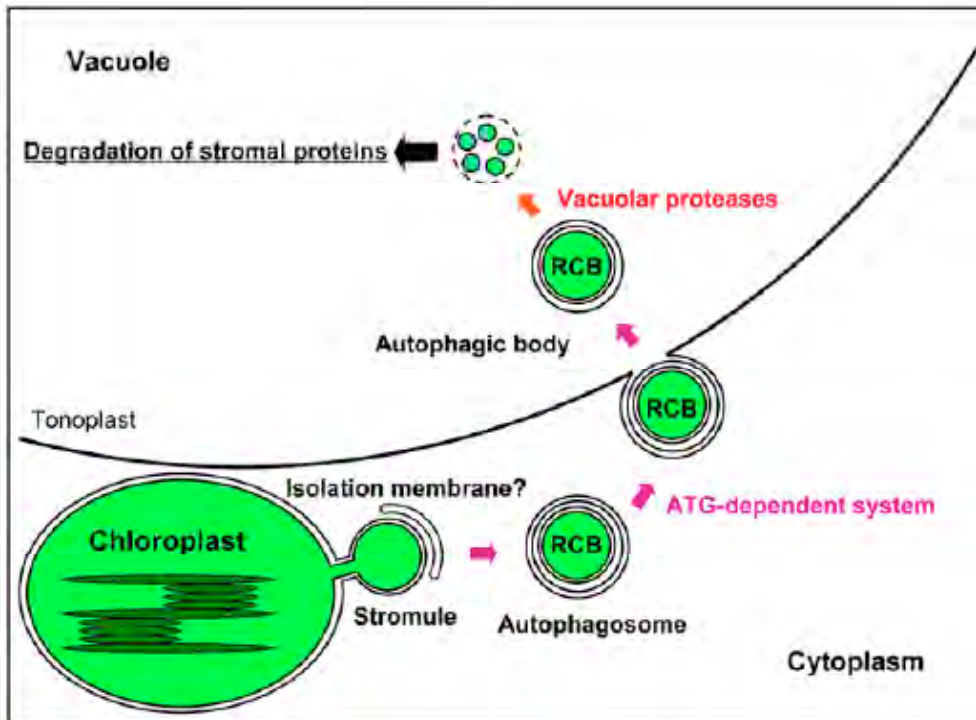


Figure 19. Modèle proposé pour la dégradation de la rubisco et probablement d'autres protéines du stroma par l'autophagie via les RCBs (Rubisco Containing Bodies).

En condition de carence nutritionnelle qui induit l'autophagie, un stromule bourgeonnant du chloroplaste est séquestré par une membrane d'isolation. Le RCB, un autophagosome contenant des contenus du stroma du chloroplaste, est formé et transporté dans la vacuole. Le RCB est dégradé par les protéases vacuolaires (D'après Ishida *et al.*, 2008).

plante entière, de biologie cellulaire et moléculaire, de biochimie, de métabolome et de transcriptome.

E. Objectifs de la thèse

Les plantes sont des organismes statiques et tributaires des ressources minérales présentes dans leur environnement. La remobilisation des nutriments est un processus qui permet une économie nutritionnelle et un recyclage de macro- et micro - nutriments qui sont le plus souvent limitants. Lors de la sénescence, qui se caractérise macroscopiquement par le jaunissement des feuilles, des macromolécules sont dégradées, et leurs produits recyclés et transportés en dehors des tissus sénescents vers les parties en croissance de la plante. Le rôle du démantèlement des chloroplastes au cours de ce processus est très important pour le recyclage de l'azote, puisque ceux-ci contiennent la majeure partie des protéines foliaires. Bien que les protéines chloroplastiques soient une source majeure pour le recyclage de l'azote foliaire, leur mécanisme de dégradation est mal connu. Un de ces mécanismes pourrait être l'autophagie.

Les objectifs de ce travail de thèse s'articulent autour de la régulation et du rôle de l'autophagie dans le recyclage de l'azote chez *Arabidopsis thaliana* en particulier lorsque la plante est soumise à une limitation en apport exogène d'azote minéral. Ce manuscrit se décline en deux parties distinctes.

Dans une première partie, j'étudie le rôle d'AtTOR comme senseur du statut nutritionnel impliqué dans la régulation de l'autophagie chez *Arabidopsis thaliana*. En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'intensification du processus d'autophagie est déclenchée lorsque les cellules perçoivent une réduction de la disponibilité en nutriments. La carence d'une part induit l'expression des gènes *ATG* et d'autre part régule l'activation des protéines *ATG* régulatrices. Le mécanisme moléculaire par lequel ce signal de carence est perçu et active le processus de régulation de l'autophagie chez la levure passe par la voie de signalisation contrôlée par TOR. Disposant au laboratoire de génotypes d'*Arabidopsis* exprimant différemment le

gène *AtTOR* et régulant l'activité de AtTOR par la rapamycine, j'ai étudié les flux autophagiques dans ces génotypes en fonction de la disponibilité en azote.

Dans la seconde partie, j'ai d'abord mené une approche plante entière par des expérimentations de marquage à l'isotope stable ^{15}N afin de déterminer l'impact de l'autophagie sur la remobilisation de l'azote des rosettes vers les graines est montré.

J'ai ensuite effectué une étude plus fine, à l'échelle tissulaire, des perturbations métaboliques liées au déficit d'autophagie. L'objectif a également été de déterminer si l'activité autophagique discrimine les différentes sources d'azote disponibles pour la remobilisation en recherchant la nature des protéines ciblées.

II. Partie 1 : REGULATION OF AUTOPHAGY BY AtTOR

Dans cette partie, le but est d'étudier le rôle d'AtTOR dans la régulation de l'autophagie en fonction de la disponibilité en azote. Le groupe que j'ai intégré pour réaliser ma thèse est nommé « Signalisation et recyclage nutritionnel ». Il s'intéresse notamment à la voie de signalisation de la protéine AtTOR. Ainsi, j'ai pu disposer au début de ma thèse de différentes lignées présentant différents niveaux d'expression d'AtTOR ainsi que les plantes transgéniques ScFKBP12 générées par Rodney Sormani. Par une approche de biologie cellulaire et de biochimie, le processus d'autophagie a été évalué dans ces différentes lignées d'AtTOR disponibles. Les résultats obtenus sont présentés ici en anglais afin de permettre leur soumission pour publication dans les mois qui viennent. Cette partie se décline donc sous la forme d'une introduction (A), des résultats (B), d'une discussion (C) et d'une partie matériels & méthodes (D) en anglais. Les différents génotypes utilisés ont été obtenus par croisement et transformation, à Versailles, au cours de ma thèse. Les traitements à la concanamycine A ont été réalisés au RIKEN lors de mes deux séjours au Japon et également répétés à Versailles.

A. Introduction

Because plants are static organisms, they have developed strategies to cope with fluctuating environment. They have elaborated high-performance processes to adapt to nutrient availability changes. Autophagy is a degradation process by which organelles and proteins are recycled into the vacuole (Bassham, 2009). The process starts with the formation of a double membrane that sequester portion of cytoplasm and organelles and form a vesicle called autophagosome. Autophagosomes are carried to the vacuole. After docking to the vacuole, the outer membrane of autophagosome fuses with the tonoplast and the autophagic body that consists in the inner membrane of autophagosome and its content is delivered inside the vacuole to be degraded by resident hydrolases.

Adaptation to fluctuating environment requires a balance between cell growth and autophagy. The Target Of Rapamycin serine/threonine protein kinase (TOR) is known to play an important role in the regulation of different pathways that lead to this balance. TOR senses the nutrient status, integrates a large set of information from upstream signal and allows a fine-tuning in the cell growth and metabolism (Wullschleger *et al.*, 2006). The protein kinase TOR is known to be a negative regulator of autophagy in yeast and animal (He & Klionsky, 2009; Jung *et al.*, 2010; Neufeld, 2010). TOR belongs to the family of phosphatidylinositol kinase-related kinase. TOR is composed notably of a carboxy-terminal serine/threonine protein kinase domain and amino-terminal domain to the kinase is the FKBP12-rapamycin binding domain (FRB domain = FKBP12 and Rapamycin Binding) (Adami *et al.*, 2007). The rapamycin drug is able to form a complex with FKBP12 that inhibits TOR activity after binding to the FRB domain (Choi *et al.*, 1996). TOR activity functions as two distinct multiprotein complexes: TORC1 and TORC2. The first one is sensitive to rapamycin and participates to the regulation of ribosome biogenesis, translation, nutrient import, stress responsive transcription and autophagy. The second one is insensitive to rapamycin and is required for the organisation of the actin cytoskeleton.

TOR proteins are well conserved among eukaryotes and homologue has been found in plant. *Arabidopsis thaliana* possesses a single *AtTOR* gene. *AtTOR* is essential to *Arabidopsis* development and the disruption of the *AtTOR* gene is lethal, causing an early stop in embryo development (Menand *et al.*, 2002). By using *Arabidopsis* T-DNA insertion lines in which the *AtTOR* gene is overexpressed and RNA interference (RNAi) lines, Deprost *et al.* (2007) was able to report some effects of *AtTOR* on plant growth, yield and mRNA translation.

In contrast to yeast and animals, *Arabidopsis* was found to be insensitive to rapamycin. The inhibitory effect of rapamycin on the TOR activity in animal and yeast is due to the presence in those organisms of a FKBP12 protein able to complex to rapamycin and then to bind to TOR kinase (Choi *et al.*, 1996). By examining the amino acid sequence of *Arabidopsis AtFKBP12*, Sormani *et al.* (2007) showed that several amino acids are replaced suggesting that *AtFKBP12* protein is incapable to bind rapamycin. The overexpression of *ScFKBP12* in *Arabidopsis* conferred rapamycin sensitivity to the transgenic lines. When treated with rapamycin, transgenic lines showed a reduction of their primary root growth and a lower accumulation of high

molecular weight polysomes. Such phenotypes are consistent with previous findings obtained with TOR RNAi lines (Deprost *et al.*, 2007; Sormani *et al.*, 2007).

In plants, autophagy is induced by nutrient starvation (Yoshimoto *et al.*, 2004) but the upstream pathway by which the signal is going through has not been clearly elucidated. Unlike higher plants, the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* is sensitive to rapamycin. The *Chlamydomonas* clones treated with rapamycin present an increase of vacuole size (Crespo *et al.*, 2005) that is a stress phenotype representative of autophagy process in yeast (Heitman *et al.* 1991). The increase of the ATG8 protein level following the rapamycin treatment gave a supplemental evidence of the role of TOR in the regulation of autophagy in photosynthetic eukaryotes (Esther Perez-Perez *et al.*, 2010). Recently, the observation of higher autophagosome number in TOR RNAi lines using monodansylcadaverin staining or GFP-ATG8 construct provided some evidence that AtTOR might also control autophagy in higher plants (Liu & Bassham, 2010).

The role of TOR as a sensor of the nutrient status in plant is supported by the phenotype of the AtTOR RNAi lines. The decrease in their root length is enhanced under nitrogen starvation conditions compared to nutrient-rich conditions (Deprost *et al.*, 2007; Liu & Bassham, 2010). By now, the link between the nitrogen status of the plant, AtTOR signaling pathway and autophagy has not been established. In the present report, we investigate the role of AtTOR in the control of autophagy machinery in response to nitrogen nutrient availability.

B. Results

1. Autophagic bodies are accumulating in root cells of TOR RNAi lines

In order to investigate and compare the activity of autophagy depending on AtTOR expression level, autophagic bodies were observed in different AtTOR backgrounds and compared to WT control by blocking their degradation using concanamycin A (conca) as described by Yoshimoto *et al.* (Yoshimoto *et al.*, 2004). Adding exogenously conca (a V-ATPase inhibitor) raises the pH of vacuolar lumen and consequently inhibits vacuolar hydrolases that normally degrade the autophagic bodies.

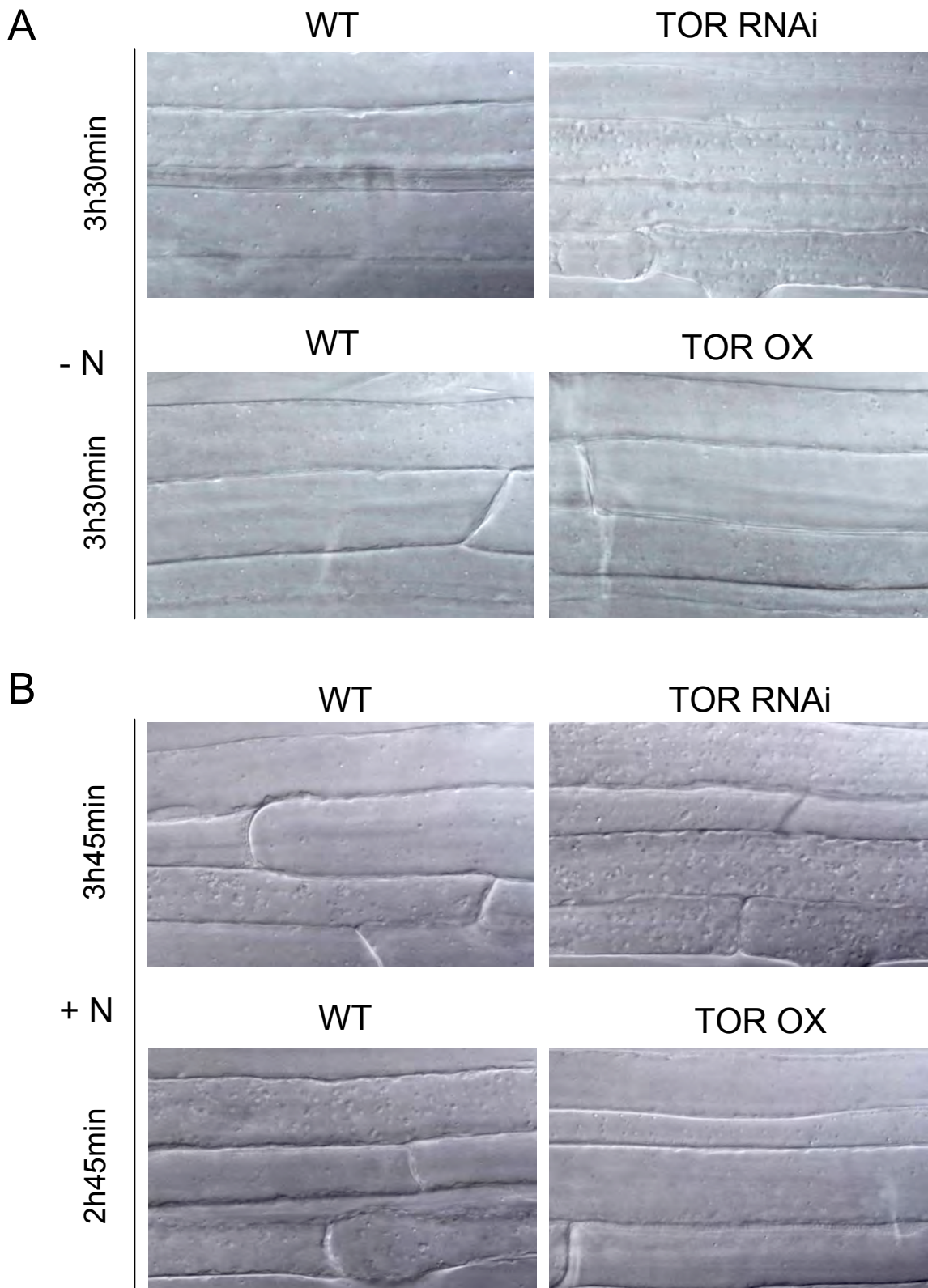


Figure 20. Autophagic bodies are accumulating in a large extent in the root cells of TOR RNAi lines. The TOR RNAi (35-7) and TOR OX (G548 and S7817) were studied giving similar result. Only 35-7 and G548 are presented here.

Roots of seven-days-old WT, TOR RNAi lines and TOR OX lines were cut and incubated in liquid MS medium (+N; panel B) or in liquid 3mM MES medium (-N; panel A), both containing 1 μ M concanamycin A. TOR lines and WT plants were mounted in the same slide to be in the same condition and time of incubation with concanamycin A. Autophagic bodies were detected by DIC microscopy. Time of incubation is indicated for each comparison.

Whole experiment was repeated four times for each genotypes with n roots = 3.

The accumulation of autophagic bodies into the vacuolar lumen then facilitates their observation by DIC microscopy.

In the assays, Col and *atg5* lines were used as positive and negative control respectively and were compared to the AtTOR RNAi line (35-7) and OX lines (G548 and S7817)(Table 2). Seeds were germinated on MS vertical plates and incubated simultaneously with concA in nitrogen depleted (-N) or nitrogen rich (+N) medium. For the comparison of control and AtTOR lines, roots were mounted in the same slide to be in the same conditions and to be observed simultaneously after incubation start.

Consistent with the defect of autophagy already described by Inoue et al. (Inoue *et al.*, 2006) in *atg5* mutant, there was no autophagic bodies detected in the root cells of *atg5*, even after a long time of concA treatment (up to 5 hours) (Figure S1, see Annexe 1). Experiment was repeated four times in both +N and -N conditions and each individual repeat included three root repeats for each genotype and each N condition. The differences between WT and AtTOR RNAi line presented in Figure 20 were observed after 3h30min and 3h45min of concA treatment at -N and +N respectively. The differences between WT and AtTOR OX presented in Figure 20 were observed after 3h30min and 2h45min of concA treatment at -N and +N respectively. Because the kinetics of bodies accumulation under -N and +N conditions was not the same, it is difficult to determine here whether the difference between AtTOR RNAi and WT were higher or lower depending on nitrogen availability. All root and experiment repeats showed that the AtTOR RNAi lines were accumulating autophagic bodies more rapidly and in a higher extent than WT. As for AtTOR RNAi and WT comparison, all the repeats performed showed that the AtTOR OX lines were accumulating less autophagic bodies than WT. The differences between AtTOR lines and WT were observed at both -N and +N conditions but at different time points. Therefore, it is difficult here to determine whether the effect of AtTOR expression on autophagic body abundance depends on nitrogen availability.

Remarque : Afin de déterminer si l'influence du statut azoté sur l'induction de l'autophagie est dépendante d'AtTOR, il est nécessaire de comparer les génotypes pour les deux conditions après le même temps d'incubation.

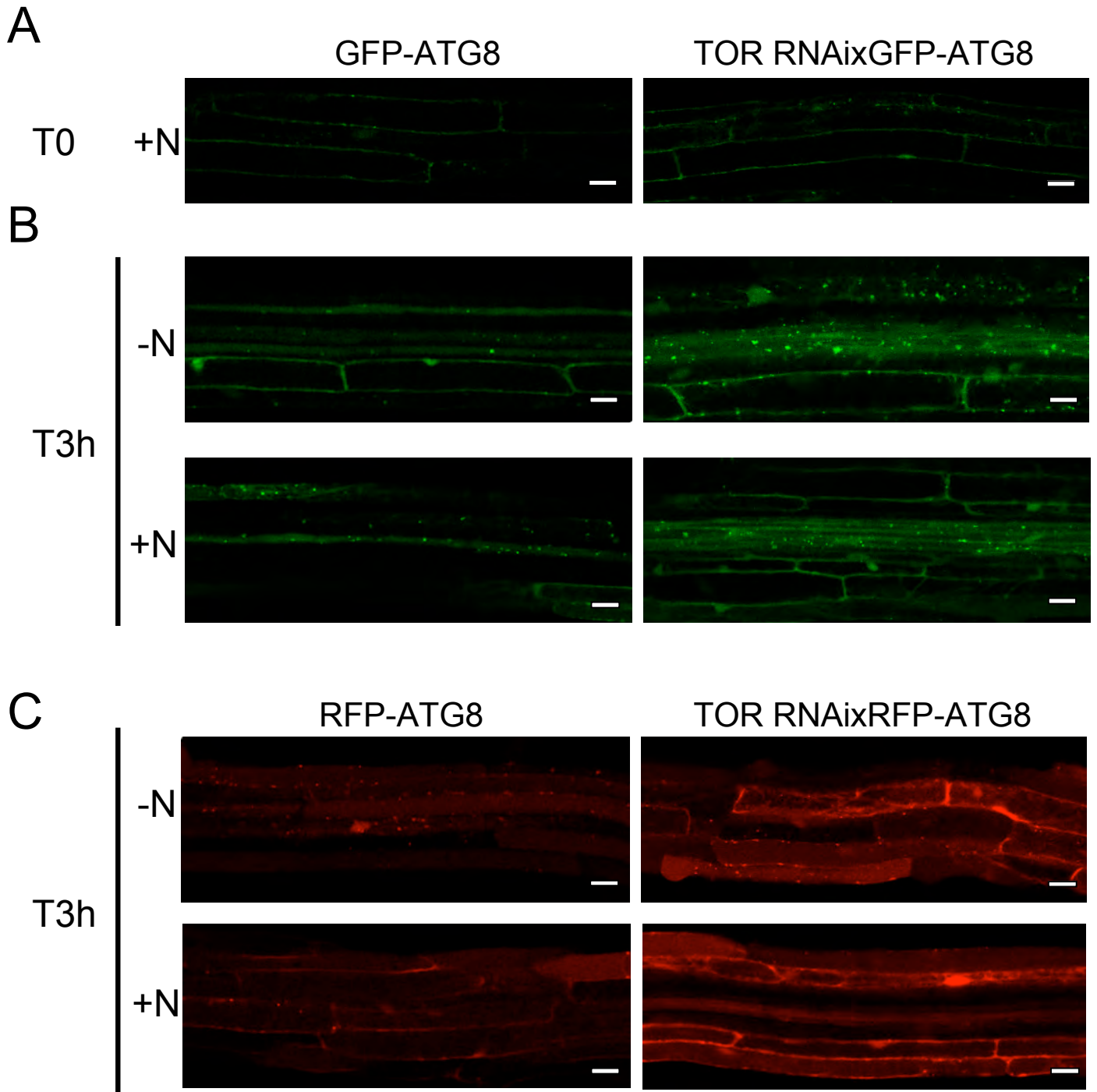


Figure 21. Autophagosome flux is controlled by TOR.

(A) At T0, roots of seven-day-old seedlings of control GFP-ATG8 and TOR RNAi x GFP-ATG8 were directly observed after cutting from the plate.

(B) For incubation in nitrogen rich (+N) or in nitrogen poor conditions (-N), roots of seven-day-old seedlings of control GFP-ATG8f and TOR RNAi x GFP-ATG8f were cut and incubated respectively in liquid MS 1% sucrose medium or in liquid 3mM MES medium during three hours. Autophagosomes were detected by confocal microscopy. Scale bar = 20 μm.

(C) For incubation in nitrogen rich (+N) or in nitrogen poor conditions (-N), roots of seven-day-old seedlings of control RFP-ATG8e and TOR RNAi x RFP-ATG8e were cut and incubated respectively in liquid MS 1% sucrose medium or in liquid 3mM MES medium during three hours. Autophagosomes were detected by confocal microscopy. Scale bar = 20 μm.

The TOR RNAi line presented is 35-7. Same experiment has been done with 65-1 x GFP-ATG8 giving the same result. Experiment was repeated three times with n roots = 3.

2. Autophagosome flux is controlled by TOR

Because autophagic body accumulation into the vacuole might be due to both higher autophagosome trafficking rate and lower autophagic degradation, we investigated the flux of autophagosome trafficking using several lines expressing GFP-ATG8 and RFP-ATG8 protein fusions (Table 2). During autophagy process, the different ATG8a-i proteins are conjugated to phosphatidylethanolamine and associated to autophagosome membranes. As such, localization of ATG8 proteins is the main marker used to monitor autophagy activity (Mizushima *et al.*, 2010). In order to verify that potential effects are not due to the nature of ATG8 proteins nor to the nature of the fluorescent protein associated to ATG8, we used three constructs overexpressing GFP-ATG8e (this work), RFP-ATG8e (this work) and GFP-ATG8f (Slavikova *et al.*, 2005). Such constructs were introduced into the WT control, into the two AtTOR RNAi lines (35-7 and 65-1) and in the AtTOR OX (S7817). Autophagosomes were then observable by confocal microscopy and autophagosomes abundance and trafficking was evaluated in the different AtTOR genetic backgrounds. The roots of seven day old seedlings grown vertically were cut and the genotypes to be compared were mounted in the same slide to be observed simultaneously. Observations were done just after roots were collected from plates (T0) and 3 hours (T3) after the beginning of incubations in -N or +N medium.

At T0, we observed that the root cells of control plant and TOR RNAi line did not present any difference in fluorescence of vesicles and *per se* in autophagosome flux (Figure 21A). This suggested that AtTOR is not the lonely factor involved in the repression of autophagy under high nutrient (N and C) availability.

After incubation for three hours in -N condition, a higher amount of fluorescent autophagosomes was observed in the AtTOR RNAi roots compared to control roots. This increase in autophagic flux was observed in the two AtTOR RNAi lines used (35-7 and 65-1) and whatever the construct used: GFP-ATG8e (not shown), GFP-ATG8f (Figure 21B) or RFP-ATG8e (Figure 21C). This indicated that the induction of autophagy by low nutrient availability was higher when AtTOR was knocked down. This confirms the role of AtTOR in the repression of autophagy at -N. Interestingly, under +N condition, autophagosomes amount was also higher in the AtTOR RNAi lines than in control. However, autophagosome fluorescence appeared slightly lower under +N condition.

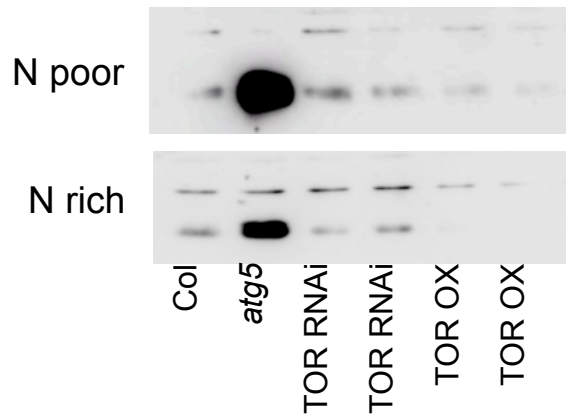


Figure 22. Western-blot in TOR backgrounds with antibody against ATG8.

Total protein samples from same amount of four-weeks-old WT (Col), *atg5*, TOR RNAi (35-7 and 65-1) and TOR OX (G548 and S7817) leaves grown on N rich or N poor condition were subjected to SDS-PAGE and immunoblot analysis with anti-ATG8a antibodies.

Differences between T0 (that represents +N conditions) and T3 (-N/+N) suggest that a part of autophagosomes accumulation during root incubation was independently controlled by N nutrient and AtTOR. Similar experiment was performed in order to compare autophagosome flux in AtTOR OX and WT under +N and -N. The very low abundance of autophagosome detected in WT and AtTOR OX does not show any convincing evidence that autophagic flux was different between the two genotypes.

3. Detection of ATG8 forms in AtTOR backgrounds using western blots

ATG8 in cells can be present as a native protein and after C-terminus processing by the ATG4 protease as a conjugate with phosphatidylethanolamine (PE) associated to the autophagosome membranes. Performing western blotting with ATG8 antibody allow us to monitor the conversion from ATG8 to ATG8-PE. Even though the molecular weight of ATG8-PE is larger than that of ATG8, ATG8-PE migrates faster in SDS-PAGE urea gels because of its high hydrophobicity (Yoshimoto *et al.*, 2004). The relative amount of ATG8-PE/ATG8 is known to correlate with the number of autophagosomes and to be representative of autophagy activity (Mizushima *et al.*, 2010). To perform immunoblotting in similar conditions as described previously (Yoshimoto *et al.*, 2004), plants were grown on soil feeding with high or low nitrogen. Plants were harvested after 4 weeks of culture in long days. 4-week-old plants have been shown to present the highest amount of ATG8 proteins. This time corresponds to the stage just before bolting, a time when autophagy is highly active (Yoshimoto *et al.*, 2004).

As it has been found before by Thompson *et al.*, (2005), a strong band that might correspond to ATG8-PE was observed in *atg5* mutant lane (Figure 22). This stronger signal was observed at +N and -N using SDS-PAGE gel. We then supposed that the upper signal corresponds to ATG8 and the lower signal to ATG8-PE. Therefore, interestingly, more ATG8 proteins were observed in the TOR RNAi lines compared to TOR OX lines. This result suggests that TOR expression level has an effect on ATG8 protein abundance. However, despite many experiment repeats, we were not able to confirm this result because no signal was detected in the membranes and we were not able to detect any signal from SDS-PAGE urea gels.

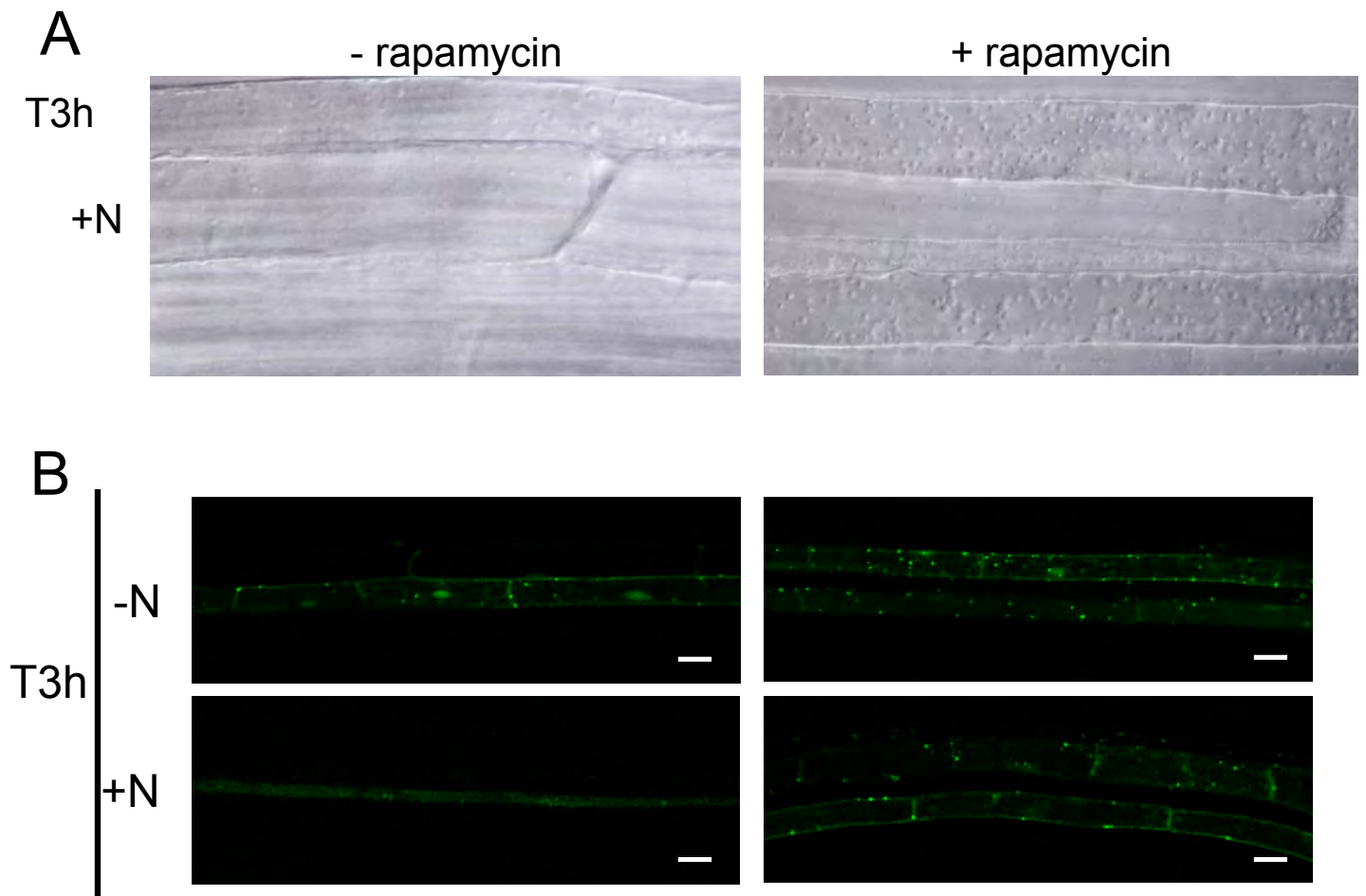


Figure 23. AtTOR activity is essential for autophagy activity.

(A) Roots of seven-day-old seedlings of ScFKBP12 OX transgenic lines were cut and incubated in liquid MS 1% sucrose medium containing 1 μ M concanamycin A supplemented or not with 10 μ g \cdot μ L⁻¹ rapamycin. Experiment was performed three times with n roots = 3, with the 25c line.

(B) Roots of seven-day-old seedlings of ScFKBP12 OX x GFP-ATG8 plants were cut and incubated in nitrogen poor (-N) or in nitrogen rich condition (+N). Autophagosomes were detected by confocal microscopy. Both 20b x GFP-ATG8 and 25c x GFP-ATG8 have been used giving similar result. Only 20b x GFP-ATG8 is presented. Experiment has been repeated three times with n roots = 3. Scale bar = 20 μ m.

*Remarque : Il est à présent important de refaire ces expériences avec des gels contenant de l'urée et d'y inclure un témoin comme le double mutant *atg4a4b*. Il serait également intéressant de faire cette expérimentation sur des échantillons racinaires, qui semblent donner un meilleur signal.*

4. AtTOR activity is essential for the direct autophagic flux regulation

While modulating AtTOR expression level using AtTOR RNAi and OX lines proved to influence autophagic flux and activity, our results did not provide any evidence that such effect was direct or indirect. Therefore we modified AtTOR activity performing rapamycin treatment on the ScFKBP12 overexpressor lines, in order to investigate the short-term effects of AtTOR activity modulation on autophagic flux. The roots of seven-days-old seedlings from two independent ScFKBP12 OX lines (Table 2) and WT were treated or not with rapamycin and *conca* for three hours in order to monitor autophagic bodies accumulation. While rapamycin had no effect on autophagic bodies accumulation in WT roots, the autophagic bodies accumulation detected in the ScFKBP12 OX lines was sharply higher in the rapamycin treated roots than in untreated roots. Rapamycin treatment on ScFKBP12 OX lines was only performed under +N condition because for unexplained reason, the ScFKBP12 OX roots hardly supported the rapamycin and *conca* treatment when performed under -N condition (Figure 23A).

The introgression of GFP-ATG8f in ScFKBP12 OX lines allowed us to monitor autophagic flux in response to rapamycin treatment. As performed before, roots of seven-days-old plants were cut and incubated in +N and -N conditions with or without rapamycin during 3 hours. Autophagosomes observation by confocal microscopy (Figure 23B) showed that the number of labeled autophagosomes was higher in rapamycin-treated roots compared to untreated roots at both +N and -N. A slightly higher autophagosome flux can be observed in -N compared to +N in the rapamycin treated and untreated roots. Results show that the inhibition of AtTOR activity by rapamycin leads to higher autophagic flux. In addition, it seems that nitrogen status can affect, even slightly, autophagosomes flux whatever rapamycin treatment.

C. Discussion

Autophagy has been reported to be negatively regulated in yeast and mammals by the TOR kinase. TOR senses the nutrient status of the cell and allows a fine-tuning of down-stream cellular processes. In plants, AtTOR was shown previously to sense nutrient availability and regulate plant growth (Deprost *et al.*, 2007). Moreover, autophagy-deficient Arabidopsis are sensitive to the nutrient starvation or limitation. The upstream regulatory components of autophagy linking this process to the nitrogen status are still unknown.

In this study autophagic activity was evaluated by the observation of autophagic bodies accumulation using *concA* and by monitoring autophagosome fluxes using GFP-ATG8 labeled autophagosomes in several lines presenting different levels of *AtTOR* expression. In the *AtTOR* RNAi lines where *AtTOR* is down-regulated, the amount of autophagic bodies accumulated in the vacuole is very high compared to the WT. At the opposite, when *AtTOR* is over-expressed, less autophagic bodies are observed in the root cells. These observations show that *AtTOR* has an effect on autophagy process whatever N condition and does not block the delivery of autophagosomes to the vacuole for degradation. Experiments performed using the GFP-ATG8 and RFP-ATG8 fusions in the different *AtTOR* backgrounds showed that autophagic flux is increased in the TOR RNAi lines. Albeit, it was more difficult to discern difference in autophagic activity between the TOR over-expressor lines and the WT, we observed however higher autophagic bodies accumulation in the WT than in *AtTOR* OX under both +N and -N condition. Difference between *AtTOR* OX and WT was observed earlier at +N, when *AtTOR* is supposed to be fully active, than at -N when *AtTOR* is supposed to be inactivated (Figure 24). This suggests that the amount of *AtTOR* active protein became rate limiting under -N condition in both *AtTOR* OX and WT. All those results then suggest that the strong effect of *AtTOR* expression on autophagic activity is not fully but partly dependent of the nutrient sensing. Such conclusion is somehow surprising considering that *AtTOR* is described as the major sensor of N status able to regulate autophagy in eukaryotes.

Furthermore, it was observed that at T0, while plants are cultivated on N rich solid medium there was no difference between the WT and *AtTOR* RNAi lines for autophagosome contents (almost none autophagic activity). Higher autophagic flux

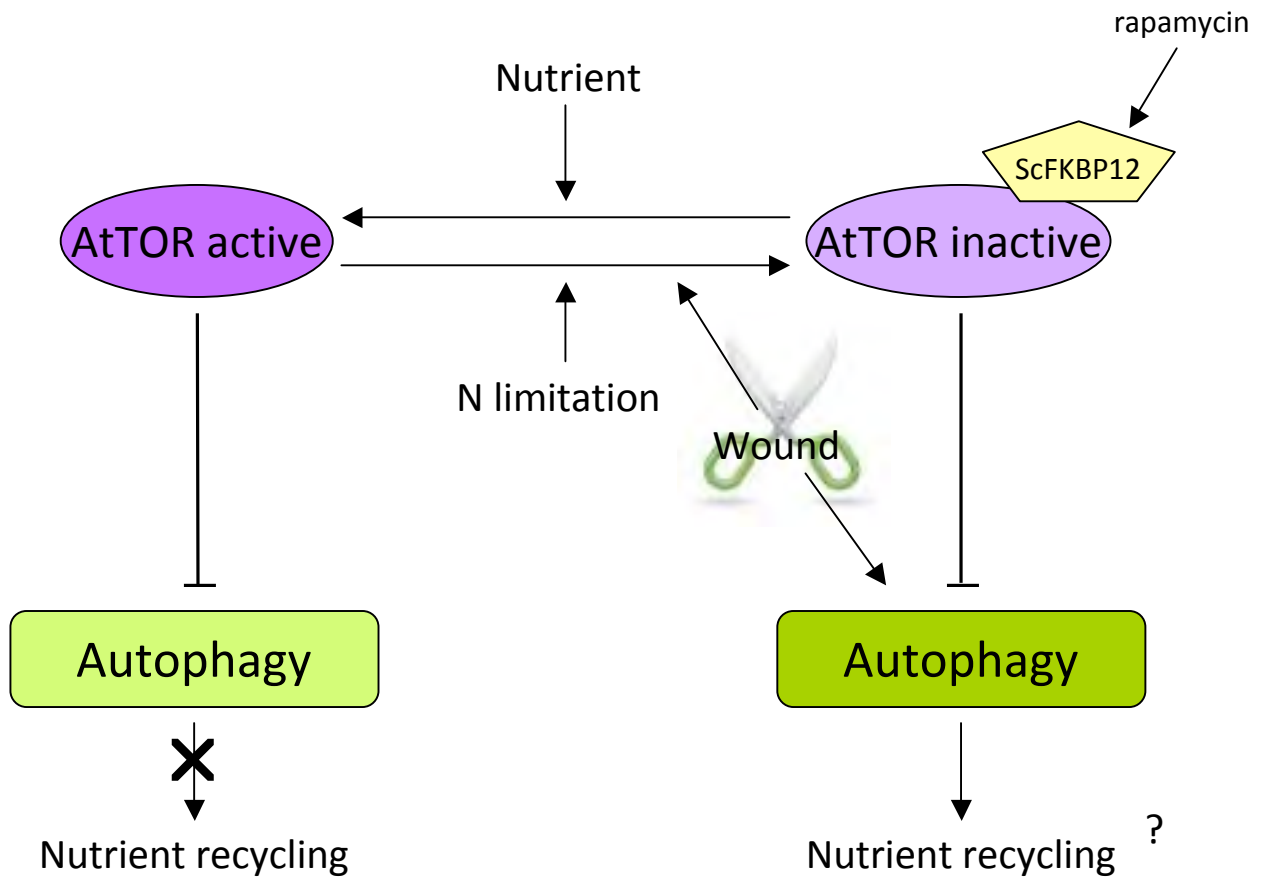


Figure 24. Model proposed for the regulation of autophagy by TOR.

In nutrient rich condition, AtTOR inhibits autophagy and does not allow nutrient recycling. N limitation inhibits AtTOR activity. AtTOR inhibition leads to the processing of autophagy. Rapamycin treatment on ScFKBP12 transgenic lines leads to the inhibition of TOR activity and the activation of autophagy. We hypothesize that wound could have an effect on autophagy.

levels were observable in AtTOR RNAi only after incubation in +N or -N conditions. This leads us to consider that cutting roots from the plate might be implied in the control of autophagy activity in our experiments. The differences observed between AtTOR lines and WT suggest then that wounding might differentially control autophagy flux through AtTOR signalling pathway (Figure 24). In order to test such hypothesis, experiments should be done with entire seedling without cutting roots to avoid side effect of wounding on autophagosome flux. Autophagic bodies that can only be observed in the root cells after incubation in concA could also be done after whole seedling treatment.

Because AtTOR over and down expression was not inducible in our system, we cannot exclude that all the effects observed on autophagic bodies accumulation and autophagosome fluorescence in the different AtTOR backgrounds were not due to side effects of the long term modulation of AtTOR expression level. By using ScFKBP12 plants, it was then possible to inactivate the activity of AtTOR kinase using short time treatments with the rapamycin drug. Inhibition of AtTOR by rapamycin leads to a high accumulation of autophagic bodies in the vacuole and to the presence of many autophagosomes in the ScFKBP12 OX root cells after only two hours of treatment. The fact that these accumulations occurred after a short incubation period, strongly suggests that the effect of AtTOR on autophagy activity is due to the direct inhibition of AtTOR kinase activity.

Finally, as reported previously, ATG8 conjugation to phosphatidyletanolamine is a good marker of autophagy flux and we tried to monitor ATG8 and ATG8-PE contents in the various AtTOR backgrounds.

As it was already observed (Thompson *et al.*, 2005), the western-blot performed with ATG8 antibody revealed a strong band in *atg5* lane (Figure 22). A band representing large amount of ATG8-PE form has been reported in several *atg* mutants suggesting that ATG8-PE can be generated ectopically in an autophagy-independent manner. However, none of these ATG8-PE species were in the membrane fraction but remained free. Similarly ATG8 lipidation occurs in yeast *atg1, 2, 6, 9, 13, 14, 16* and *17* mutants (Suzuki *et al.*, 2001).

Our western blot experiments showed an accumulation of both ATG8-PE and ATG8 like proteins in the AtTOR RNAi lines grown in N poor and N rich conditions, giving a

Genetic background	Name in this study	References
<i>atg5.1</i>	<i>atg5</i> mutant	Inoue <i>et al.</i> , 2005
35-7	AtTOR RNAi	Deprost <i>et al.</i> , 2007
65-1	AtTOR RNAi	Deprost <i>et al.</i> , 2007
G548	AtTOR OX	Deprost <i>et al.</i> , 2007
S7817	AtTOR OX	Deprost <i>et al.</i> , 2007
GFP-ATG8f	GFP-ATG8	Slavikova <i>et al.</i> , 2005
GFP-ATG8e	GFP-ATG8	This study
RFP-ATG8e	RFP-ATG8	This study
20b	ScFKBP12 OX	Sormani <i>et al.</i> , 2007
25c	ScFKBP12 OX	Sormani <i>et al.</i> , 2007
35-7xGFP-ATG8f	AtTOR RNAixGFP-ATG8	This study
65-1xGFP-ATG8f	AtTOR RNAixGFP-ATG8	This study
S7817xGFP-ATG8f	AtTOR OXxGFP-ATG8	This study
35-7xRFP-ATG8e	AtTOR RNAixRFP-ATG8	This study
20bxGFP-ATG8f	ScFKBP12 OXxGFP-ATG8	This study
25cxGFP-ATG8f	ScFKBP12 OXxGFP-ATG8	This study

Table 2. Table presenting the lines used in this study.

confirmation of the regulation of autophagic process by AtTOR. It was also likely that both ATG8-PE and ATG8 like protein were less abundant in the AtTOR OX lines. Experiments have to be repeated and also performed in urea gels in order to confirm and complete these observations.

Substrates of AtTOR in autophagy machinery are not known in plants. In yeast and animals, TOR phosphorylates ATG1 and ATG13. In plants, two homologs for ATG13 and three homologs for ATG1 have been found. By now, it has not been determined whether these homologues play roles in autophagy and none of their mutant has been described so far. Homologs of ATG17, ATG29 and ATG31, which are constituents of the ATG1 kinase complex have not been found in Arabidopsis. The isolation of proteins in plants that are functionally related to these proteins would help to elucidate the mechanisms controlling induction of plant autophagy (Yoshimoto *et al.*, 2010).

It is not easy to work with genes family but it would be interesting to investigate whether AtTOR is able to phosphorylate one or several of the ATG1 and ATG13 protein homologues in Arabidopsis.

D. Materials and Methods

1. Plant materials and growth conditions

The *Arabidopsis thaliana* AtTOR, ScFKBP12 and GFP-ATG8 and RFP-ATG8 lines used in this study are listed in Table 2.

For western-blot experiments, plants were grown on soil during four weeks (16h light at 20°C, 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ /8h dark at 18°C, humidity in the growth chamber 80%). Plants were watered three times per week with nutritive solution containing 2mM (N poor) or 10mM (N rich) nitrate. Compositions of nutritive solutions are described in Chardon *et al.* (Chardon *et al.*, 2010). Rosettes were harvested four weeks after sowing, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before further experiments.

For plate assays and drug treatments seeds were surface sterilized with 0.1% Tween 20 and 5% (v/v) bleach solution for 5 min, followed by cold treatment for 2 days. Seeds were then sown on solid MS medium (Murashige and Skoog Plant Salt Mixture),

1% sucrose and 0.4% gelrite (Wako, Japan) in square plates and vertically grown at 23°C under continuous light condition.

2. Concanamycin A for autophagic bodies observation

The primary roots of Arabidopsis seedlings grown on vertical plate for one week as described above, were cut and incubated in Murashige and Skoog 1% sucrose (pH5.7), containing 60 mM of nitrogen, (+N) or MES (3mM, pH5.7) nitrogen free buffer (-N). In both N+ and N- media, 1 μ M of concanamycin A (concaA; C-9705; Sigma-Aldrich), solubilised in dimethyl sulfoxide (DMSO), was added. For no concaA control, the same volume of DMSO was added to the +N and -N media. Incubation in concaA was performed for 2 to 4 hours at 23°C in the dark.

For autophagic bodies observation, primary roots treated with concaA were mounted in the incubation solution and observed by conventional transmission light microscope (Olympus BX51) with differential interference contrast (DIC).

3. Rapamycin treatment

As described above, the primary roots of Arabidopsis seedlings grown on vertical plate for one week were cut and incubated in +N and -N media containing rapamycin ($10\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) with (for autophagic bodies observation using conventional transmission light microscope) or without (for autophagosome observation using confocal microscopy) 1 μ M concanamycin A (C-9705; Sigma-Aldrich). Rapamycin mother solution (x1000) was solubilised in ethanol. Control with no rapamycin contained the same volume of ethanol than assay.

4. Generation of GFP-ATG8e and RFP-ATG8e transgenic plants and observation of autophagosome flux in root cells

The full length coding sequence of *AtATG8e* lacking stop codon was first amplified with the following primers 5'-AAAAAGCAGGCTCCAAAATGAATAAAGGAAGCATCTTT-3' and 5'-AGAAAGCTGGGTCGATTGAAGAAGCACCGAATGT-3'. The PCR product was then

cloned in pDONR207 by BP reaction. By LR reaction, the chimeric gene was cloned in pGWB6 (GATEWAY Binary Vector, Invitrogen) or pH7WGR2 (GATEWAY Binary Vector, VIB Ghent) vectors which contains respectively GFP and mRFP in 5' of the gene. The construct was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain (C58PMP90) by electroporation, and then into *Arabidopsis thaliana* Columbia plants and AtTOR lines by *Agrobacterium*-mediated transformation using the floral dip method. Homozygous T2 transformants were selected by antibiotic resistance.

The crossing of the different AtTOR lines with GFP-ATG8f (Slavikova *et al.*, 2005) and with GFP-ATG8e plants was performed.

Wild type, AtTOR and ScFKBP12 plants containing GFP-ATG8f, GFP-ATG8e or RFP-ATG8e construct (Table 2) were screened using antibiotic resistance and PCR genotyping. Homozygous TOR RNAi lines were selected by PCR using the 5'-GCGCTCTAGACTCGAGGGTTGCCATACTTTGGCAT-3' and 5'-GCGCAAGCTTGGTACCTGGCTAGCTGTTTGTCAATC-3' primers. Transgenic lines overexpressing ScFKBP12 were selected by PCR using the following primers: 5'-GAATTTCCCCAGGTGATGGT-3' and 5'-AACATCCCAACCCTTGATGA-3'.

The primary roots of the transgenic plants expressing GFP-ATG8 were mounted in the incubating solutions (+N or -N) for microscopic observation using LSM 710 laser scanning microscope (Zeiss, Jena, Germany). Images were captured using ZEN 2010 Software.

5. Protein extraction and immunoblot analysis

Plant tissue was ground in a mortar in liquid N₂ and 100 mg of fresh matter was homogenized in 0.5 mL SDS sample buffer (63 mM Tris-HCl pH6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 2,5% 2-Mercaptoethanol). The extracts were clarified by centrifugation at 14 000 rpm for 10 min. The supernatant was used for total protein separation. Total protein from equivalent amounts of tissue fresh weight was subjected to SDS-PAGE (15% acrylamide running gel) and transferred in a nitrocellulose membrane (BioTrace NT, PALL Life Sciences). The membranes were blocked using 5% milk powder. ATG8a primary antibody (Yoshimoto *et al.*, 2004) was diluted 1:500 in TBS (10mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl). The secondary antibodies used were peroxidase conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Signals were detected using

the Immun Star WesternC kit (Bio-Rad, Hercules, CA) and images were captured using the ImageQuant LAS 4000 CCD camera system (GE Healthcare, Life Sciences).

III. Partie 2 : L'AUTOPHAGIE, UNE ETAPE CLEF DU RECYCLAGE DE L'AZOTE

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction générale, la remobilisation de l'azote est un processus important permettant une économie nutritionnelle à la plante. Elle implique la dégradation de macromolécules et le transport des produits générés vers les parties en croissance de la plante. Le rôle du démantèlement des chloroplastes au cours de ce processus est très important pour le recyclage de l'azote, puisque ceux-ci contiennent la majeure partie des protéines foliaires. Bien que les protéines chloroplastiques soient une source majeure pour le recyclage de l'azote foliaire, leur mécanisme de dégradation est mal connu. Un des mécanismes qui pourrait y participer est l'autophagie. C'est sur cette hypothèse que repose la seconde partie de ma thèse puisqu'elle traite des rôles de l'autophagie dans le recyclage de l'azote.

Cette partie est divisée en deux sous parties. La première partie, menée à l'échelle de la plante entière, est basée sur la détermination des flux d'azote grâce aux marquages à l'azote 15 entre la rosette et les graines chez les mutants d'autophagie. Grâce à ces expérimentations, nous avons pu montrer l'impact de l'autophagie dans la remobilisation de l'azote. Cette partie est présentée sous la forme d'un article de recherche. La seconde sous partie est une étude fonctionnelle des mutants d'autophagie en condition ou non de limitation en azote. Par cette approche, notre objectif était d'établir un diagnostic métabolique lié au déficit d'autophagie. Nous avons également pour but de déterminer si l'autophagie peut-être sélective envers différentes sources d'azote disponibles et de déterminer la nature des protéines ciblées.

Plusieurs mutants d'autophagie ont été utilisés pour cette étude. Les mutants *atg5-1* et *atg9-2* nous ont été fournis par Yoshinori Oshumi et la plante transgénique RNAi-ATG18a nous a été fournie par Diane Bassham (Xiong *et al.*, 2005). Les mutants *atg5-1* et *atg9-2* sont tous les deux des mutants d'insertion provenant de la banque de l'institut du SALK (San Diego, CA, USA) et sont décrits comme des mutants knock-out (KO).

A. L'autophagie participe à la remobilisation de l'azote

Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole plant level under both limiting and ample nitrate conditions in *Arabidopsis*.

Anne Guiboileau¹, Kohki Yoshimoto², Fabienne Soulay¹, Marie-Paule Bataillé³, Jean-Christophe Avice³ and Céline Masclaux-Daubresse^{1*}

¹ Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB) UMR 1318, INRA 78026 Versailles Cedex, France

² RIKEN, Plant Science Center, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0045, Japan

³ INRA, UMR INRA-UCBN 950, Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutrition N,C,S, Université de Caen, F-14000 Caen, France

ABSTRACT

Processes allowing the recycling of organic nitrogen and export to sinks like young leaves and seeds are important determinants of plant yield, especially when plants are nitrate limited. Because autophagy is induced during leaf ageing and in response to nitrogen starvation, its role in nitrogen remobilization was suspected. It was indeed recently shown that autophagy participates to the trafficking of Rubisco Containing Bodies to the vacuole. To investigate the role of autophagy in nitrogen remobilization, several autophagy-defective (*atg*) *Arabidopsis* mutants were grown under low and high nitrate supplies and labeled with $^{15}\text{NO}_3^-$ at vegetative stage in order to determine nitrogen remobilization through monitoring ^{15}N partitioning in seeds at harvest. Results showed that nitrogen remobilization efficiency was significantly lower in *atg* mutants than in wild type irrespective to biomass defects and whatever nitrogen conditions. Because *atg* mutants displayed earlier and more rapid leaf senescence than wild type under low nitrogen supply especially, we investigated whether their defects in

nitrogen remobilization were related to premature leaf cell death. The stay green *atg* mutants, deficient for salicylic acid production, *atg5.sid2* and *atg5.NahG*, were labeled with ¹⁵N and comparison with the wild type, *sid2*, *NahG* and *atg5* single mutants allowed us to demonstrate that the autophagy core machinery is needed to remobilize nitrogen to the seeds.

INTRODUCTION

Autophagy is an ubiquitous proteolytic process in eukaryotic cells that permits protein breakdown and amino-acids recycling *via* a non-selective lysosomal/vacuolar proteolysis (Nakatogawa *et al.*, 2009; Yoshimoto *et al.*, 2010; Reumann *et al.*, 2010). Autophagy pathway is conserved across strata and genetic screens in yeast have identified several *ATG* (*AuTophagy*) genes that are required for the formation of the double membrane vacuoles named autophagosomes, that deliver products to be recycled into lytic vacuoles. Orthologues of *ATG* genes are present in plants and approaches to assess their function have been undertaken using complementation of yeast *atg* mutants and by studying RNA interference (RNAi) and knock out mutants (Hanaoka *et al.*, 2002; Doelling *et al.*, 2002; Yoshimoto *et al.*, 2004; Xiong *et al.*, 2005, Contento *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2005). Using GFP-ATG8 fusions as marker of autophagosome in *Arabidopsis*, it was also possible to monitor the defects of mutants and RNAi lines in their autophagic flux. In all the *atg* mutants isolated so far, early age-dependent leaf senescence symptoms and hypersensitivity to nitrogen and carbon starvation were observed (Hanaoka *et al.*, 2002; Xiong *et al.*, 2005; Thompson & Vierstra, 2005). Xiong *et al.* (2007) showed that autophagy pathway play a role in cleaning cells from oxidized proteins accumulated due to ageing or stress. More recently, Yoshimoto *et al.* (2010) proposed that the over accumulation of salicylic acid (SA), of high levels of reactive oxygen species is involved in the early cell death and senescence phenotypes observed in the old leaves of *atg* mutants. By over expressing the bacterial salicylate hydroxylase *NahG* in *atg* mutants and by crossing *atg* mutants with *sid2* mutant, which is a SA biosynthesis defective mutant, early leaf senescence symptoms were indeed reversed (Yoshimoto *et al.*, 2009).

Plants are static organisms. Their ability to recycle and remobilize nutrients is crucial for adaptation to fluctuating environment. Processes allowing the recycling of

organic nitrogen and export from old senescing organs to sinks like seeds, are important determinants of plant productivity and yield and organic nitrogen recycling becomes more than ever essential when plants are starved for nitrogen (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010, for review). It is known for a long time that the main source for nitrogen recycling and remobilization during leaf ageing is chloroplast (Masclaux *et al.*, 2000). The ways by which chloroplast proteins are degraded during leaf senescence (induced or not by nitrogen starvation) are not fully understood. It was shown that Rubisco degradation can occur both inside and outside the chloroplast (Martinez *et al.*, 2008; Reumann *et al.*, 2010 for reviews) and that oxidative environment occurring in chloroplast during senescence or in response to stress catalyze Rubisco fragmentation. Oxidized rubisco peptides bind to the chloroplast envelope (García-Ferris & Moreno, 1994) to be delivered into cytoplasmic vacuole type compartments named “Rubisco containing bobies” (RCB) (Chiba *et al.*, 2003; Prins *et al.*, 2008). Recently evidences autophagy machinery participate to the RCB traffic to the central vacuole were provided (Ishida *et al.*, 2008; Wada *et al.*, 2009; Izumi *et al.*, 2010). The *atg5* mutation that compromises autophagy flux disrupted accumulation of RCB.

The fact that *atg* mutants present hypersensitivity to nitrogen, reduced seed production, and reduced RCB accumulation in senescing leaves is accepted as several evidence that autophagy participate to nitrogen recycling and mobilization in Arabidopsis. However none of the studies reported so far has investigated N recycling and remobilization in *atg* mutants.

In order to investigate the role of autophagy in nitrogen remobilization at the whole plant level, we grew at first three *atg* mutant and RNAi lines (*atg5-1*, *atg9-2* and *atg18a* RNAi line) and explored their nitrogen remobilization efficiency (NRE) under high and low nitrate supplies, using ¹⁵N tracing as done by Masclaux-Daubresse & Chardon (2011). The *ATG5*, *ATG9* and *ATG18* genes disrupted or knock-down in those mutants are all involved in the first steps of autophagosome expansion and enclosure (Thompson & Vierstra, 2005). The defect of those mutations on autophagic flux is well documented (Xiong *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2005). Because *atg* mutants display early and fast leaf senescence phenotypes compare to wild type, and because leaf nitrogen remobilization needs time to proceed fully, we also monitored the part of nitrogen remobilization decrease due to their shorter leaf lifespan. The *atg5.sid2* and *atg5.NahG* lines previously characterized by Yoshimoto *et al.* (2009) appeared suitable

to avoid the side effects due to premature cell death. Introgression of *sid2* mutation and over expression of NahG in *atg* mutants are indeed suppressing the early leaf senescence phenotypes of *atg* mutants (Yoshimoto *et al.*, 2009).

MATERIALS AND METHODS

Plant material and growth conditions

Seeds of the *Arabidopsis thaliana* Columbia and seeds of *atg5-1* [SALK_020601], *atg5-2* [SAIL_129B07], *atg9-2* [SALK_130796], *atg5-1.sid2*, *atg5-2.NahG* have been characterized in previous reports (Hanaoka *et al.*, 2002; Inoue *et al.*, 2006; Yoshimoto *et al.*, 2009). In their previous study, Yoshimoto *et al.* (2009) have preferred *atg5-2* to *atg5-1* for over expression of NahG gene because exogenously over expressed genes are often silenced in *atg5-1* background. Seeds of the *AtATG18a* RNAi transgenic plants (RNAi18) were kindly provided by Dr Diane C. Bassham (Iowa State University, IA, USA) and produced by Xiong *et al.* (2005).

Plants were cultivated on sand under low nitrogen nutrition (LowN, 2 mM nitrate) or under high nitrogen nutrition (HighN, 10 mM nitrate) as described in Chardon *et al.* (2010). Plants were grown in short days (8 h light) with 21°C day and 17°C night temperatures until they have 56 DAS (days after sowing) and then transferred to long day (16 h light) maintaining similar day/night temperatures. A first set of experiment was carried on, sowing seeds of *atg5-1*, *atg9-2*, RNAi18 and Col genotypes on sand according to Masclaux-Daubresse & Chardon (2011). A second set of experiment was performed by sowing seeds of *atg5-1*, *atg5-2*, *atg5-1.sid2*, *atg5-2.NahG*, *sid2*, *NahG* and Col genotypes. Two independent biological repeats were carried out for each set of experiments, in two consecutive culture cycles in the same growth chamber. Each biological repeat included four plant repetitions for the first set of experiment, and six plant repetitions for the second set.

¹⁵N labeling and harvest

Pulse ¹⁵N-labelling was performed according to Masclaux-Daubresse & Chardon (2011) on vegetative plants at two time points (40 DAS and 42 DAS), a long time before flowering and harvest (that occurred about two month and half later). The unlabeled watering solutions were replaced by solutions that had the same nutrient composition

except that plants were supplied with $^{15}\text{NO}_3^-$ (10 atom% excess) in order to obtain plants with homogeneous ^{15}N labeling. After labeling, plant roots and sand were rinsed carefully with deionised water and unlabeled nutrient solutions were used for the rest of the culture cycle. At harvest, plants were separated as (i) dry remains [DR=rosette + stem + cauline leaves + siliques] and (ii) total seeds [SEEDS]. The dry weight (DW) of the DR and SEEDS were determined.

Determination of total nitrogen content and ^{15}N abundance

Unlabeled samples were harvested in order to determine the ^{15}N natural abundance. Determination of ^{15}N abundance in all the samples collected (labeled and unlabeled) was performed on dry matters as described in Diaz *et al.* (2008). The ^{15}N abundance was calculated as atom percent and defined as $A\% = [100 \times (^{15}\text{N}) / (^{15}\text{N} + ^{14}\text{N})]$ and nitrogen concentration (N%) as mg of nitrogen per 100 mg of dry weight. The ^{15}N enrichment (E%) was calculated as $(A_{\text{sample}}\% - A_{\text{control}}\%)$. The absolute quantity of ^{15}N contained in a sample was defined as $Q = [\text{DW} \times E\% \times \text{N}\%]$. The partition of ^{15}N in the seeds compared to the whole plant was calculated as $(Q_{\text{SEEDS}}) / (Q_{\text{SEEDS}} + Q_{\text{DR}})$ and named ^{15}NHI according to Masclaux-Daubresse and Chardon (2011).

Indicator used to monitor nitrogen use efficiency (NUE) and nitrogen remobilization efficiency (NRE)

Harvest index (HI), a key indicator for yield was calculated as the $(\text{DW}_{\text{SEEDS}}) / (\text{DW}_{\text{DR}} + \text{DW}_{\text{SEEDS}})$ ratio. DW and nitrogen concentrations (N%) were combined to determine the nitrogen harvest index (NHI) as $(\text{N}\%_{\text{SEEDS}} \cdot \text{DW}_{\text{SEEDS}}) / (\text{N}\%_{\text{DR}} \cdot \text{DW}_{\text{DR}} + \text{N}\%_{\text{SEEDS}} \cdot \text{DW}_{\text{SEEDS}})$ which is a key indicator of grain filling with nitrogen. Since plant morphology and harvest index varied depending on genotype, the ratio NHI/HI (named ΔNHI) was calculated as a % of Col control in order to compare nitrogen use efficiency (NUE) performances between genotypes. In a similar manner we combined DW, N% and ^{15}N enrichments (E%) to determine the partition of ^{15}N in seeds (^{15}NHI as ^{15}N -Harvest-Index), which is the proportion of ^{15}N absorbed at the vegetative stage and remobilized to the seeds at the reproductive stage. ^{15}NHI calculated as $[E\%_{\text{SEEDS}} \times \text{N}\%_{\text{SEEDS}} \times \text{DW}_{\text{SEEDS}}] / [(E\%_{\text{DR}} \times \text{N}\%_{\text{DR}} \times \text{DW}_{\text{DR}}) + (E\%_{\text{SEEDS}} \times \text{N}\%_{\text{SEEDS}} \times \text{DW}_{\text{SEEDS}})]$ is an indicator for nitrogen remobilization efficiency to the seeds (NRE). Again due to the plant morphology and harvest index genetic variations, the ratio $^{15}\text{NHI}/\text{HI}$ (named

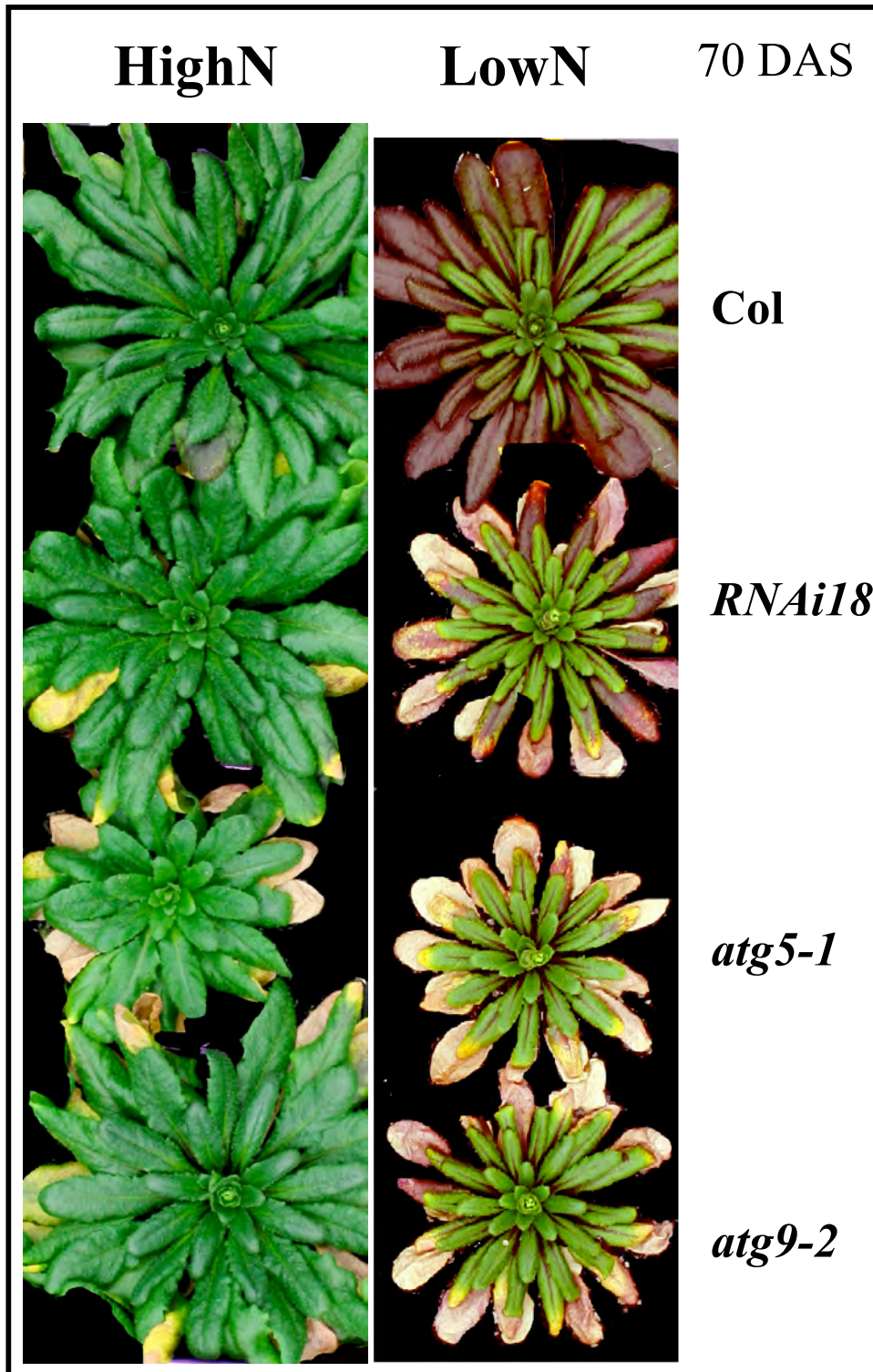


Figure 1: Early senescence phenotype of autophagy-defective mutants under nitrogen-rich and nitrate limiting conditions. The wild type, *atg5-1*, *atg9-2* and RNAi18 Arabidopsis lines were grown on sand under short-day (8h light/16h dark) condition for 56 days after sowing (DAS), then transferred to long-day (16h light/8h dark) until harvest. Plants were grown under nitrate-rich (HighN, on the left) and nitrate-limiting (LowN, on the right) conditions. Phenotypes of rosettes at 70 DAS are shown.

Δ Rem) was estimated as % of Col control to compare the nitrogen remobilization efficiency (NRE) performances between genotypes independently of biomass effects. The C%_{SEEDS} and N%_{SEEDS} are key indicators for seed filling. More details about the significance of all the indicators cited above can be found in Masclaux-Daubresse & Chardon (2011).

Statistical analysis

Experiments were carried out in two independent biological repeats (R1 and R2) performed as two consecutive culture cycles in the same growth chamber. ANOVA Newman-Keuls (SNK) comparison was performed using XLSTAT. ANOVA analyses were carried out using raw data for all the measured and calculated traits in order to analyze the effects of genotypes, nutrition and biological repeats as well as their interactions. ANOVA analyses are presented in Supplemental Fig.S1 and show that the strongest effects were due to genotypes and nutrition, while repeats effects were lower for most of the traits. Data were however normalized according to the mean of repeats R1 and R2 before being used for further analysis. The number of plant repeats was then eight and twelve for the set one and set two of experiments. Principal Component Analysis was performed using the MEV4.3 software.

RESULTS

Autophagy is essential for vegetative biomass and seed production whatever plant nutrition but does not modify harvest index

In order to investigate the effect of the autophagy core machinery on plant yield and grain filling in response to nitrogen nutrition, three autophagy mutants (*atg5-1* and *atg9-2*) and one RNAi line (RNAi18 for *ATG18a* RNAi) previously characterized in three different laboratories were studied at first (Hanaoka *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2005; Xiong *et al.*, 2005). As described previously, *atg5-1*, *atg9-2*, RNAi18 were senescing early compared to wild type and were hypersensitive to nutrient limitation (Figure 1). The dry weight of their dry remains (DR, Fig.2AB) and total seeds (SEEDS, Fig.2CD) were indeed lower than that of wild type and dry weight differences between mutants and wild type were higher under low (LowN) than under high nitrogen nutrition (HighN). However, there was no significant difference of harvest index

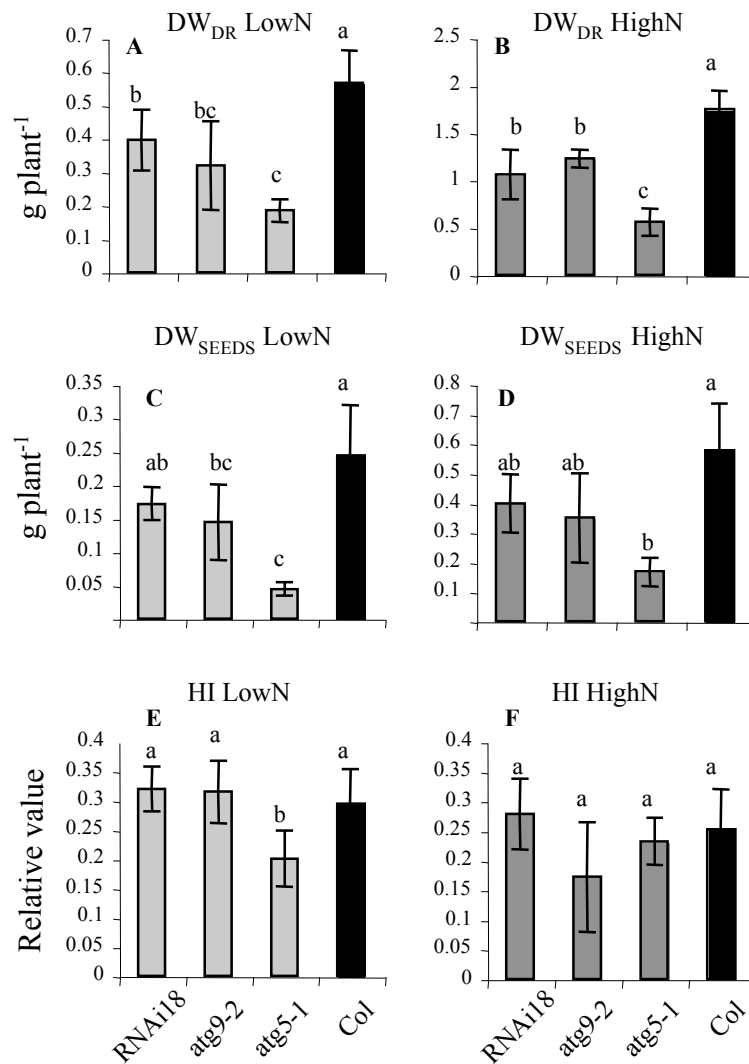


Figure 2: Statistical evaluation of biomass and yield under nitrate limiting (LowN) and nitrate rich (HighN) conditions. The dry weight of the dry remains (DR) (A, B) the dry weight of total seeds (SEEDS) (C,D) and the harvest index (HI= $DW_{SEEDS}/(DW_{SEEDS}+DW_{DR})$) (E,F) of wild type (dark bar) and autophagy mutants (grey bars) were measured and computed at LowN (A,C,E) and HighN (B,D,F). Data are the adjusted means and standard deviations from two biological repeats numbering four plants each. The different letters indicate values significantly different at $p < 0.05$ ($n=8$) as determined using XLSTAT ANOVA Newman-Keuls (SNK) comparison.

$[HI = DW_{SEED} / (DW_{SEEDS} + DW_{DR})]$ between *atg9-2*, RNAi18, *atg5-1* and wild type, except at LowN where *atg5-1* displayed stronger leaf senescence, biomass and yield phenotypes (Fig.2EF).

Autophagy modifies the nitrogen status of plants as well as nitrogen allocation to the seeds and dry remain

The nitrogen concentration (N% as $mg.(100\text{ mg DW})^{-1}$), measured in the dry remains (DR) and seeds (SEEDS) of wild type and mutants, showed that while autophagy defects poorly modified N%_{SEEDS}, it dramatically increased N%_{DR} at LowN (supplemental Table S1 available online). The higher N%_{DR} observed in *atg5* in this experiment was confirmed further (see Table 1 discussed in next paragraphs). Using N% and DW data, the nitrogen harvest index (NHI), which is the partitioning of nitrogen in seeds $[(N\text{ content in SEEDS}) / (N\text{ content in whole plant})]$ and a familiar agronomic indicator of N seed filling, was computed. The *atg5-1* mutant was the single line to display significant difference with wild type for NHI, and only at LowN (Fig.3AB). In order to determine whether the NHI defect of *atg5-1* is due to lower seed production, we compared the relative modifications in HI and NHI, considering the so called ΔNHI ($=NHI/HI$) indicator as a good indicator of the variation of nitrogen use efficiency (NUE) in plants (Masclaux-Daubresse and Chardon, 2011). The significantly lower ΔNHI observed in *atg5-1*, *atg9-2* and RNAi18 compared to wild type at both LowN and HighN (Fig.3EF) indicated that autophagy plays a role in grain nitrogen use efficiency independently of effects on seed productivity.

Autophagy plays a role in nitrogen use efficiency, modifying nitrogen remobilization efficiency

In order to examine whether autophagy play a role in plants nitrogen remobilization to the seeds we used an improved method consisting in monitoring ¹⁵N flux performing pulse chase experiments (Masclaux-Daubresse & Chardon, 2011). The labeled ¹⁵N isotope provided to plants as a pulse of ¹⁵NO₃⁻ in the early steps of rosette development was found afterwards in the seeds and in the dry remains at harvest. We estimated that the soil was rinsed enough after the labeling pulse to avoid further uptake of ¹⁵NO₃⁻ during the chase period. The partitioning of ¹⁵N in seeds (as % of total ¹⁵N content in the whole plant) is representative of the ability of plants to remobilize the

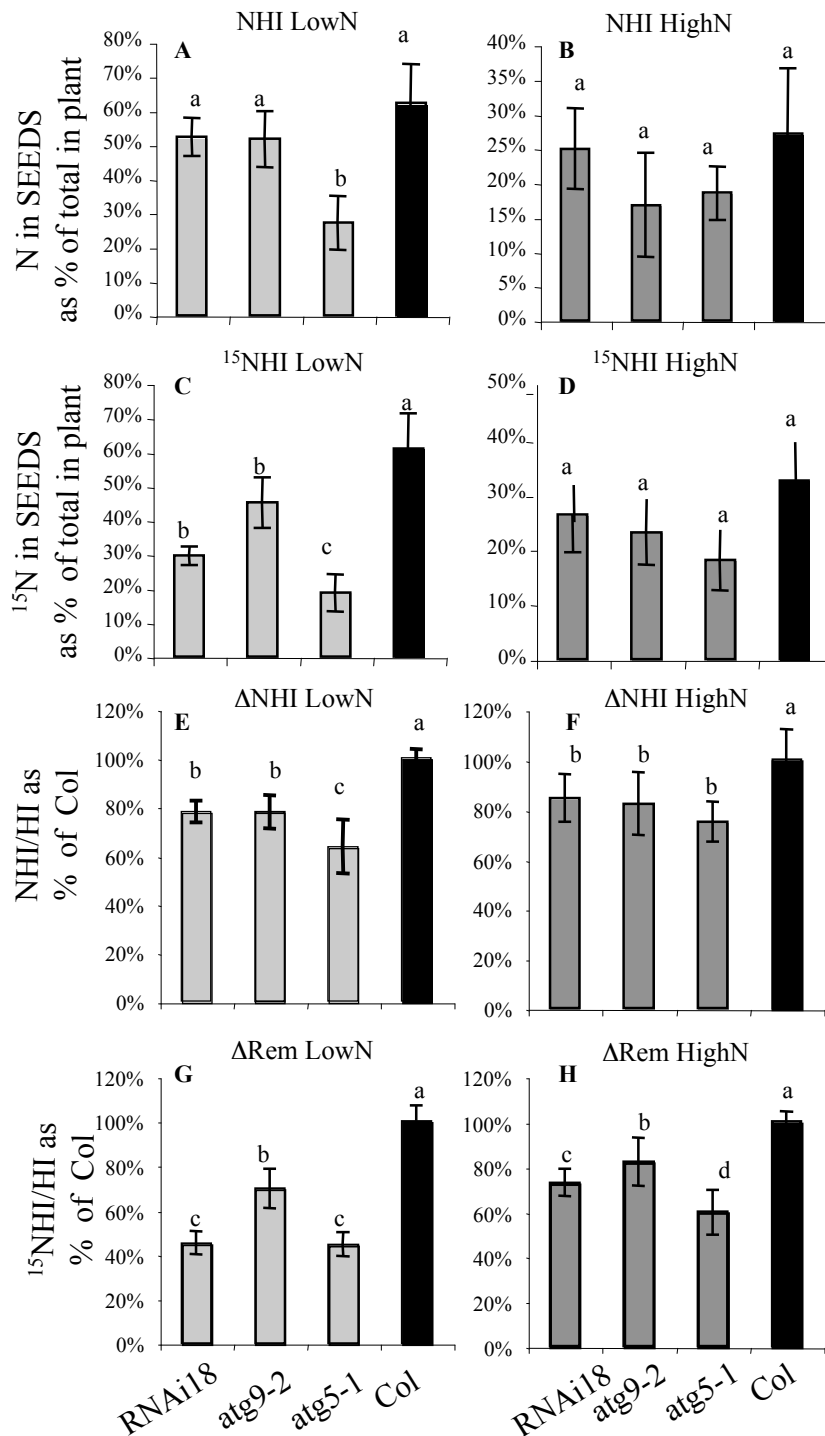


Figure 3: Nitrogen use efficiency and nitrogen remobilization efficiency are decreased in autophagy mutants. The partitioning of total nitrogen and of ¹⁵N in seeds (NHI and ¹⁵NHI, respectively) were computed (A, B, C and D). Normalized ratios ΔNHI and ΔRem were calculated as NHI and ¹⁵NHI divided by harvest index HI and expressed as % of Col value. ΔNHI and ΔRem were used as indicators to estimate nitrogen use efficiency and nitrogen remobilization efficiency respectively according to Masclaux-Daubresse and Chardon (2011). Values estimated at LowN and HighN are adjusted means from two biological repeats with four individual plants each (n=8). Black lines indicate standard deviations. The different letters indicate values significantly different at p<0.05 as determined using XLSTAT ANOVA Newman-Keuls (SNK) comparison.

^{15}N assimilated in their rosette leaves at vegetative stage. The abundances of ^{15}N in seeds and dry remains were determined using isotopic ratio mass spectrometry and allowed us by combining with the DW and N% data to calculate the partitioning of ^{15}N in seeds (^{15}NHI , ^{15}N -Harvest-Index). By contrast with HI and NHI, ^{15}NHI was significantly and sharply lower at both LowN and HighN, in all the *atg* mutants and RNAi line compared to the wild type (Fig.3CD). This finding showed that nitrogen remobilization to the seeds was affected by the autophagy activity. By computing the ΔRem ($=^{15}\text{NHI}/\text{HI}$) indicator that provides a normalization of ^{15}NHI according to the sink-source ratios, results showed that the effect of autophagy defect on nitrogen remobilization efficiency (NRE) was independent of its effect on plant biomass and productivity (Fig.3GH).

Nitrogen remobilization defect observed in autophagy mutants is not only a side effect due to premature leaf cell death

Because the autophagy lines studied above were early senescing, their nitrogen remobilization defects might be due to premature cell death. Indeed, despite an important function of leaf senescence is to reallocate nitrogen from source tissues to other parts of the plant, this process needs time to occur and has to be completed before the death of the leaf structures.

In order to determine the role of autophagy machinery in nitrogen resource mobilization independently of senescence side effects, we used the *atg5-1.sid2* and *atg5-2.NahG* double mutants previously described by Yoshimoto *et al.* (2009). Yoshimoto *et al.* (2009) showed that the over expression of *NahG* into *atg5-2* mutant and the introgression of *sid2* mutation into *atg5-1* lowered salicylic acid production in those plants compared to *atg5* mutants and suppressed the senescence phenotypes observed in *atg5*. Accordingly to Yoshimoto *et al.* (2009), we showed that under our conditions *atg5-2.NahG* and *atg5-1.sid2* double mutants senesced later than *atg5* at LowN and HighN (Supplemental Fig.S2). In addition, the comparisons of *atg5-1*, *atg5-2*, Col, *sid2* and *NahG* with *atg5-1.sid2* and *atg5-2.NahG* biomasses showed that at both LowN and HighN, *atg5-2.NahG* and *atg5-1.sid2* mutants have recovered partially but not fully the dry remain and seed biomasses of wild type (supplemental Fig.S3). Harvest index (HI) of *atg5-2.NahG* and *atg5-1.sid2* was also significantly higher than that of *atg5-2* and *atg5-1* but also significantly lower than that of wild type, *sid2* and *NahG* lines (Fig.4AB).

The determination of $\text{N}\%_{\text{DR}}$ and $\text{N}\%_{\text{SEEDS}}$ in all the mutant and control lines

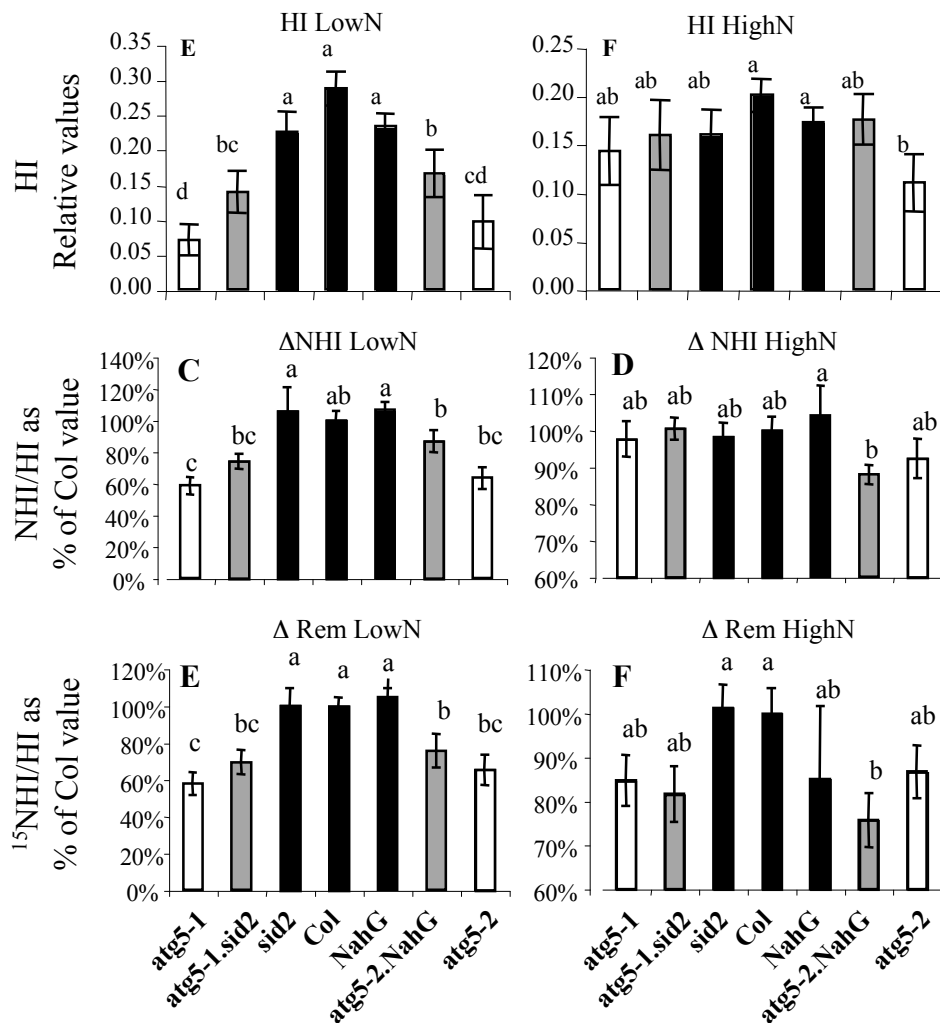


Figure 4: Comparison of harvest index, nitrogen use efficiency and nitrogen remobilization efficiency indicators in autophagy mutants and stay-green autophagy mutants under nitrate limiting (LowN) and nitrate rich (HighN) conditions. Harvest index ($HI = DW_{SEEDS} / (DW_{SEEDS} + DW_{DR})$) (A,B), ΔNHI (C,D) and ΔRem (E,F) of controls (dark bar), autophagy mutants (white bars) and stay-green *atg5-1.sid2* and *atg5-2.NahG* autophagy mutants (grey bars) were measured and computed at LowN (A,C,E) and HighN (B,D,F). Normalized ratios ΔNHI and ΔRem indicators were calculated as NHI and ^{15}NHI divided by harvest index HI and expressed as % of the Col wild type. HI of the stay-green *atg5-1.sid2* and *atg5-2.NahG* double mutants were intermediate between *atg5-1* and *atg5-2* mutant alleles and controls. ΔNHI and ΔRem are not significantly different between the autophagy *atg5-1* and *atg5-2* mutant alleles and the stay-green *atg5-1.sid2* and *atg5-2.NahG* double mutants as shown by the letters below bars, but significant differences with controls are estimated at both LowN and HighN. Note that scales are different at LowN and HighN. Values are adjusted means from two biological repeats with six individual plants each ($n=12$). Black lines indicate standard deviations. The different letters indicate values significantly different at $p < 0.05$ ($n=12$) as determined using XLSTAT ANOVA Newman-Keuls (SNK) comparison.

confirmed that in the *atg5* mutants, nitrogen concentrations are higher than in Col under both LowN and HighN conditions (Table 1). The $N\%_{DR}$ of *atg5-1.sid2* and *atg5-2.NahG* were intermediate between the *atg5-1* and *atg5-2* mutants and the Col, *NahG* and *sid2* controls, and appeared closer to that of *atg5-1* and *atg5-2* mutants. The $N\%_{SEEDS}$ was not different between *atg5-1* and *atg5-1.sid2* or between *atg5-2* and *atg5-2.NahG*. All the *atg5* single and double mutants also presented a significantly lower $C\%_{SEEDS}$ than controls.

Computing NHI and ^{15}NHI showed that those indicators were not different between the *atg5-1.sid2* and *atg5-2.NahG* double mutants and the *atg5-1* and *atg5-2* single mutants at HighN and were slightly increased in *atg5-1.sid2* and *atg5-2.NahG* compared to *atg5-1* and *atg5-2* at LowN (supplemental Fig.S4). However, the NHI and ^{15}NHI recovery at LowN was weak and values remained significantly lower than those of control lines.

As done previously, ΔNHI and ΔRem were computed to estimate NUE and NRE independently of the effects of mutations on the sink/source ratio. Results show that at LowN, ΔNHI and ΔRem were significantly lower in all the *atg5-1*, *atg5-2*, *atg5-1.sid2* and *atg5-2.NahG* single and double mutants than in Col, *sid2* and *NahG* controls (Fig.4CE). At HighN, ΔNHI was significantly reduced in both *atg5-2* and *atg5-2.NahG* mutants compared to Col and *NahG* controls (Fig.4D) and ΔRem was significantly lower in *atg5-1* and *atg5-1.sid2* compared to Col and *sid2* and in *atg5-2* and *atg5-2.NahG* compared to Col (Fig.4F). The large standard deviation obtained for the ΔRem data of *NahG* did not allowed us to observe significant difference with *atg5-2*.

In order to assess differences between mutants and controls, a principal component analysis was performed using the DW_{DR} , $N\%_{DR}$, DW_{SEEDS} , $N\%_{SEEDS}$, HI, ΔNHI and ΔRem data. Principal Component Analysis (PCA) shows that at LowN group 1 (*atg5-1* and *atg5-2*) overlapped with group 2 (*atg5-2.NahG*, *atg5-1.sid2* double mutants) and was clearly separated from group 3 (Col, *sid2* and *NahG*), (Fig.5A). At HighN, group 1 was clearly distinct from group 3 and group 2 was in-between, overlapping with both (Fig.5B). This indicates that both SA-dependent leaf-senescence and autophagy controlled nitrogen plant status and partitioning at HighN, while autophagy appeared to be the main dominant factor affecting nitrogen plant status, remobilization and partition in seeds at LowN.

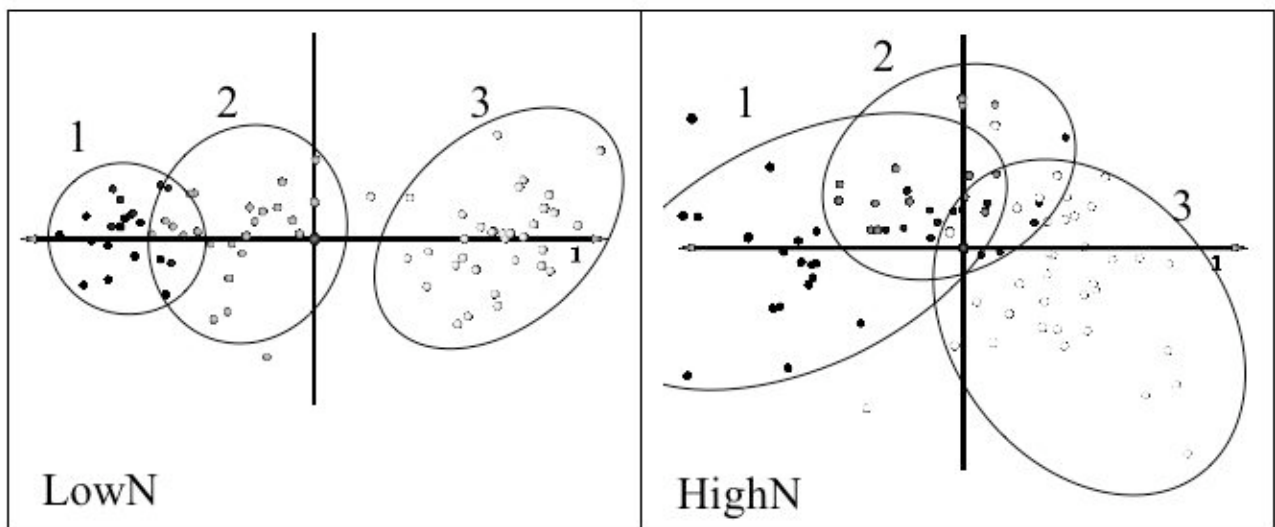


Figure 5: Differences between group 1 (*atg5-1* and *atg5-2*, black dots), group 2 (*atg5-1.sid2* and *atg5-2.NahG*, grey dots) and group 3 (*Col*, *sid2* and *NahG* controls, white dots) illustrated using Principal Component Analysis representation and performed using the DW_{DR} , $N\%_{DR}$, DW_{SEEDS} , $N\%_{SEEDS}$, HI, ΔNHI and ΔRem data estimated under nitrate limiting (left) and nitrate rich (right) conditions. PCA was performed using MEV3;4 software.

DISCUSSION

In the present report, we provide evidences of the role of autophagy machinery in nitrogen remobilization at the whole plant level for seed production. Because it is not known, up to now, how to enhance autophagy genetically, through manipulating gene expression or repressor/activator for example, we examined traits of autophagy mutants and wild type under both nitrogen limiting and ample conditions as well as under two different light regimes known to modulate autophagy level. Two sets of experiments were performed. The first one used mutants and RNAi lines targeting three different *ATG* genes. All of these *ATG* genes have already been described as part of the core machinery functioning in the formation of pre-autophagosome expansion and enclosure (Thompson & Vierstra, 2005 for review). The severity of the leaf yellowing phenotypes, the defects in biomass and harvest index observed were stronger in *atg5-1* mutant than in *atg9-2* and RNAi18 lines. Those differences were consistent with the severity of autophagic flux defects described for these lines in previous studies. Autophagic activity monitored using GFP-ATG8 fusion showed that *atg5* mutants do not produce any autophagosome whatever environmental conditions studied. At the reverse, few remaining GFP-ATG8 labeled autophagosomes can be detected in *atg9-2* and RNAi18 leading authors to consider these lines as “leaky” (Yoshimoto *et al.*, 2004 and Guiboileau A. personal communication for RNAi18). Despite such difference, all the autophagy defective lines presented lower nitrogen remobilization efficiency under low and high nitrate conditions compared to wild type. By computing ΔRem and ΔNHI , we observed that ΔNHI was less affected than ΔRem in mutants. This indicates that in mutants N seed filling was not only determined by the remobilization of nitrogen from the rosette but was also dependent of the uptake of unlabelled nitrate after labeling and certainly during seed development. Since the ΔRem of mutants was significantly lower than that of wild type, we also concluded that the diminution of nitrogen remobilization observed in the autophagy defective lines was not linked to the shrinkage of their seed sink compartment and was actually independent of the effect of autophagy defects on harvest index.

Nitrogen remobilization is usually associated to leaf senescence because many proteases and enzymes involved in this process are induced during ageing (Masclaux *et al.*, 2000; Diaz *et al.*, 2008; Desclos *et al.*, 2009). It was nevertheless observed that

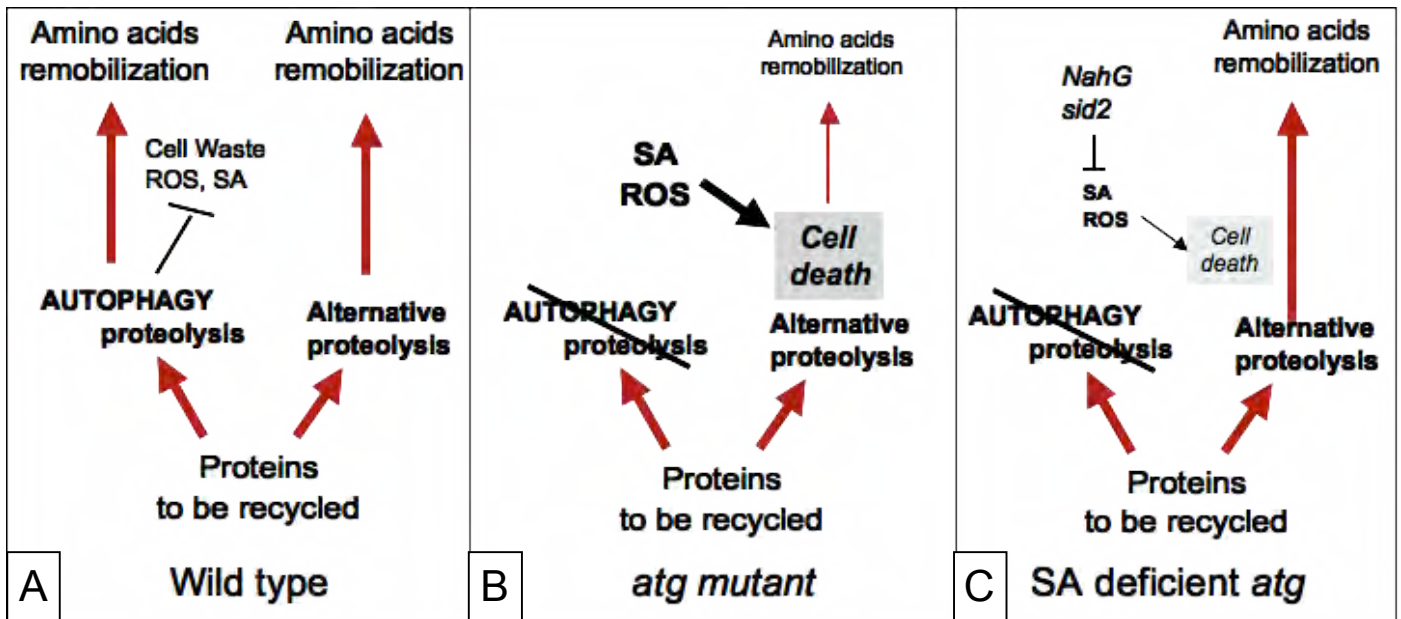


Figure 6: Schematic presentation of the possible role of autophagy machinery in nitrogen resources degradation and remobilization to sink organs. In wild type (A) proteins to be recycled are proteolysed *via* autophagy pathway as well as alternative pathways. Autophagy also controls cell waste accumulation, oxidative stress and salicylic acid (SA) pathway. Autophagy mutants (B) are no more able to recycle nitrogen from a part of the protein resources and are defective in managing cell waste, reactive oxygen species and SA. Defects in autophagy-dependent proteolysis and premature cell death due to SA over-accumulation restrict amino acid remobilization. In autophagy mutants defective for salicylic acid production (C), premature senescence is prevented and the remobilization of the amino acids provided by the alternative proteolysis pathways partially restored.

remobilization needs time to proceed and is compromised when cell death occurs too rapidly to permit complete protein recycling (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010; Guiboileau *et al.*, 2010). Because lower nitrogen remobilization in autophagy mutants might have been a side effect due to the earlier and too rapid leaf senescence, the *atg5-1.sid2* and *atg5-2.NahG* lines recently modified by Yoshimoto *et al.* (2009) for SA signaling were also studied. The second set of experiments that used these double mutants allowed us to verify that the phenotypes observed previously on *atg5-1* can be repeated using the second *atg5-2* mutant. At both LowN and HighN, the two *atg5* mutants exhibited lower HI, Δ NHI and Δ Rem than Col. Again their Δ NHI was less affected than their Δ Rem. The same traits measured and computed for the *atg5-1.sid2* and *atg5-2.NahG* showed intermediate phenotypes between the *atg5* mutants and the Col, *sid2* and *NahG* controls. Because at LowN, the phenotype of *atg5-1.sid2* and *atg5-2.NahG* were closer to that of *atg5* mutants than to controls, we conclude that autophagy machinery defects was the main factor affecting nitrogen remobilization.

Despite the defects of *atg5* single and double mutants in nitrogen remobilization, their nitrogen concentrations in seeds ($N\%_{SEEDS}$) were slightly - by reference to the large natural variation observed by Masclaux-Daubresse & Chardon (2011) - but significantly higher than control. Higher $N\%_{SEEDS}$ in mutant seeds was correlated to lower $C\%_{SEEDS}$. It then appeared that all the *atg5* mutants also had defects in seed filling with carbon, may be due to their lower rosette size and as such lower leaf photosynthetic area. The fact that nitrogen over accumulation in autophagy mutants was not only observed in seeds but was also measured in the dry remains at harvest as well as in rosettes at vegetative stage, indicates that autophagy machinery could be involved in nitrogen resource recycling through constant protein turn over and participate to global nitrogen use efficiency.

Like in animal, autophagy is likely to play an important role in nitrogen management in plant and in adaptation to nutrient restriction. Figure 6 proposes a model for the role of autophagy in nitrogen recycling and remobilization in leaves. Because autophagy is involved in long life protein and organelle recycling (Maiuri *et al.*, 2007; Ishida *et al.* 2008), as well as in cell waste degradation and SA signaling regulation (Yoshimoto *et al.*, 2009), autophagy machinery facilitates nutrient recycling and export as well as cell longevity (Fig.6A). The difficulties of autophagy mutants in nitrogen remobilization are certainly due to their inability to digest and recycle proteins and

other nitrogen resources in vegetative tissues. In addition, cell waste accumulating with ageing in autophagy mutant leaves could promote premature cell death and by the way affect remobilization of some amino acids produced from alternative proteolytic pathways (Fig.6B). Such side effect premature leaf senescence is confirmed by the partially recovered N remobilization flux observed on *atg5-1.sid2* and *atg5-2NahG* for (Fig.6C).

The significant and strong effect of autophagy on nitrogen remobilization efficiency, N seed filling and leaf senescence observed in Arabidopsis provides the first evidence of the importance of autophagy machinery in nitrogen management, remobilization and nitrogen use efficiency at the whole plant level.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors thank Dr Diane Bassham (Iowa State University, IA, USA) who kindly provided the *AtATG18a* RNAi transgenic plants (RNAi18).

REFERENCES

- Chardon F, Barthélémy J, Daniel-Vedele F, Masclaux-Daubresse C. 2010.** Natural variation of nitrate uptake and nitrogen use efficiency in Arabidopsis thaliana cultivated with limiting and ample nitrogen supply. *Journal of Experimental Botany* **61**: 2293-2302
- Chiba A, Ishida H, Nishizawa NK, Makino A, Mae T. 2003.** Exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. *Plant and Cell Physiology* **44**: 914-921
- Contento AL, Xiong Y, Bassham DC. 2005.** Visualization of autophagy in Arabidopsis using the fluorescent dye monodansylcadaverine and a GFP-AtATG8e fusion protein. *Plant Journal* **42**(4): 598-608.
- Desclos M, Etienne P, Coquet L, Jouenne T, Bonnefoy J, Segura R, Reze S, Ourry A, Avice JC. 2009.** A combined ¹⁵N tracing/proteomics study in *Brassica napus* reveals the chronology of proteomics events associated with N remobilisation during leaf senescence induced by nitrate limitation or starvation. *Proteomics* **9**: 3580-3608

- Diaz C, Lemaitre T, Christ A, Azzopardi M, Kato Y, Sato F, Morot-Gaudry JF, Le Dily F, Masclaux-Daubresse C. 2008.** Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in *Arabidopsis* under low nitrogen nutrition. *Plant Physiology* **147**: 1437-1449
- Diaz C, Saliba-Colombani V, Loudet O, Belluomo P, Moreau L, Daniel-Vedele F, Morot-Gaudry J-F, Masclaux-Daubresse C. 2006.** Leaf yellowing and anthocyanin accumulation are two genetically independent strategies in response to nitrogen limitation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **47**: 74-83
- Doelling JH, Walker JM, Friedman EM, Thompson AR, Vierstra RD. 2002.** The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 33105-33114
- García-Ferris C, Moreno J. 1994.** Oxidative modification and breakdown of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase induced in *Euglena gracilis* by nitrogen starvation. *Planta* **193**: 208-215
- Guiboileau A, Sormani R, Meyer C, Masclaux-Daubresse C. 2010.** Senescence and death of plant organs: Nutrient recycling and developmental regulation. *Comptes Rendus de Biologies* **333**: 382-391
- Hanaoka H, Noda T, Shirano Y, Kato T, Hayashi H, Shibata D, Tabata S, Ohsumi Y. 2002.** Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an *Arabidopsis* autophagy gene. *Plant Physiology* **129**: 1181-1193
- Inoue Y, Suzuki T, Hattori M, Yoshimoto K, Ohsumi Y, Moriyasu Y. 2006.** AtATG genes, homologs of yeast autophagy genes, are involved in constitutive autophagy in *Arabidopsis* root tip cells. *Plant and Cell Physiology* **47**: 1641-1652
- Ishida H, Yoshimoto K, Izumi M, Reisen D, Yano Y, Makino A, Ohsumi Y, Hanson MR, Mae T. 2008.** Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiology* **148**: 142-155
- Izumi M, Wada S, Makino A, Ishida H. 2010.** The Autophagic Degradation of Chloroplasts via Rubisco-Containing Bodies Is Specifically Linked to Leaf Carbon Status But Not Nitrogen Status in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **154**: 1196-1209

- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. 2007.** Self eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **8**: 741-752
- Martinez DE, Costa ML, Guamet JJ. 2008.** Senescence-associated degradation of chloroplast proteins inside and outside the organelle. *Plant Biology (Stuttg)* **10 Suppl 1**: 15-22
- Masclaux C, Valadier MH, Brugiere N, Morot-Gaudry JF, Hirel B. 2000.** Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* **211**: 510-518
- Masclaux-Daubresse C, Chardon F. 2011.** Exploring nitrogen remobilization for seed filling using natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **62**: 2131-2142
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A. 2010.** Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* **105**: 1141-1157
- Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. 2009.** Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**: 458-467
- Prins A, van Heerden PDR, Olmos E, Kunert KJ, Foyer CH. 2008.** Cysteine proteinases regulate chloroplast protein content and composition in tobacco leaves: a model for dynamic interactions with ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) vesicular bodies. *Journal of Experimental Botany* **59**: 1935-1950
- Reumann S, Voitsekhovskaja O, Lillo C. 2010.** From signal transduction to autophagy plant cell organelles: lessons from yeast and mammals and plant-specific features. *Protoplasma* **247**: 233-256
- Thompson AR, Doelling JH, Suttangkakul A, Vierstra RD. 2005.** Autophagic nutrient recycling in *Arabidopsis* directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. *Plant Physiology* **138**: 2097-2110
- Thompson AR, Vierstra RD. 2005.** Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 165-173

-
- Wada S, Ishida H, Izumi M, Yoshimoto K, Ohsumi Y, Mae T, Makino A. 2009.** Autophagy Plays a Role in Chloroplast Degradation during Senescence in Individually Darkened Leaves. *Plant Physiology* **149**: 885-893
- Xiong Y, Contento AL, Bassham DC. 2005.** AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **42**: 535-546
- Xiong Y, Contento AL, Nguyen PQ, Bassham DC. 2007.** Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **143**: 291-299
- Yoshimoto K, Jikumaru Y, Kamiya Y, Kusano M, Consonni C, Panstruga R, Ohsumi Y, Shirasu K. 2009.** Autophagy Negatively Regulates Cell Death by Controlling NPR1-Dependent Salicylic Acid Signaling during Senescence and the Innate Immune Response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**: 2914-2927
- Yoshimoto K, Takano Y, Sakai Y. 2010.** Autophagy in plants and phytopathogens. *Febs Letters* **584**: 1350-1358

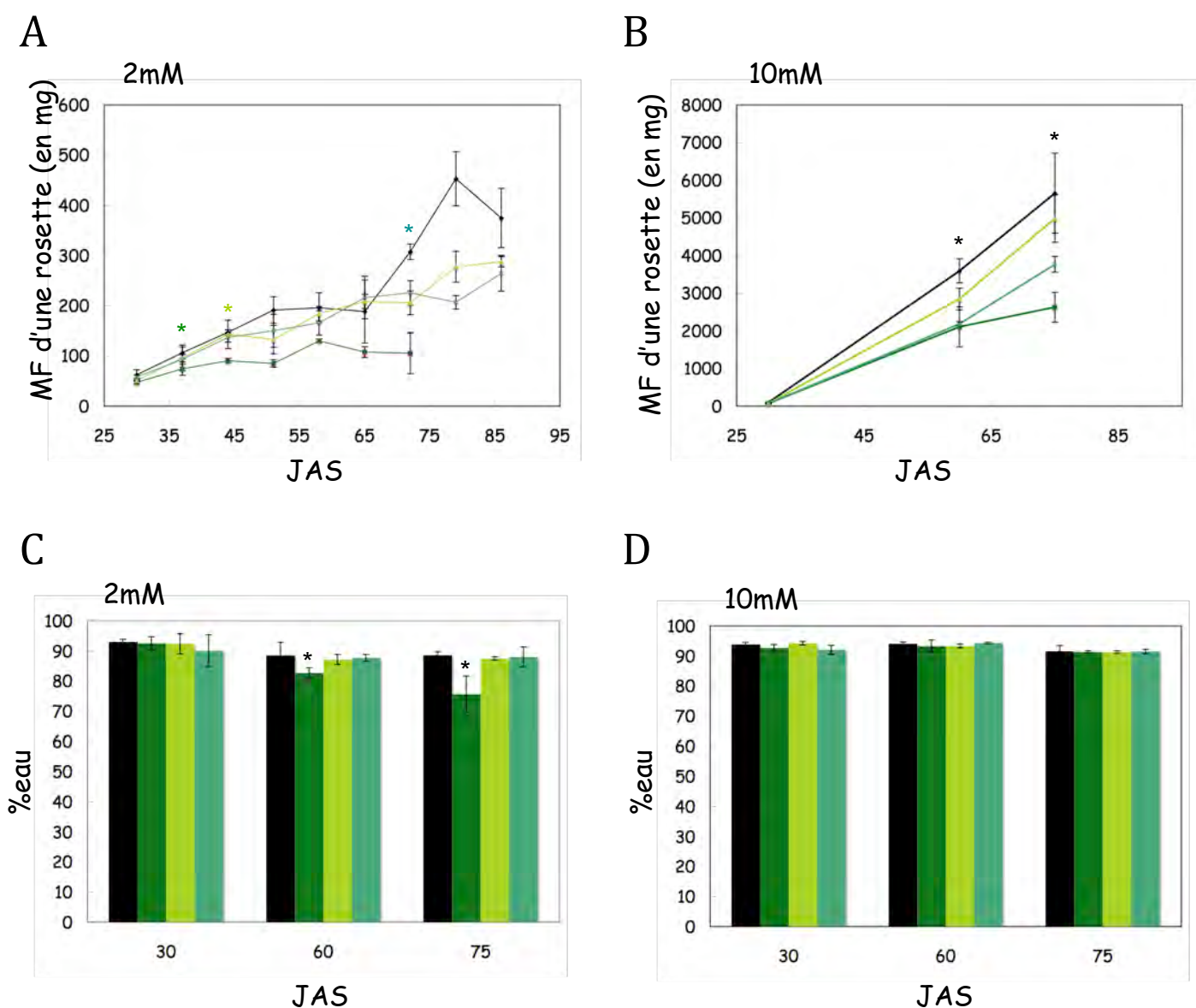


Figure 25. Biomasses des mutants d'autophagie *atg5*, *atg9* et RNAi-18 en condition limitante en azote ou en condition pléthorique.

(A) Evolution de la masse fraîche d'une rosette au cours du développement sur 2mM de nitrate.

(B) Evolution de la masse fraîche d'une rosette au cours du développement sur 10mM de nitrate.

(C) Pourcentage en eau dans les rosettes cultivées sur 2mM de nitrate et prélevées à 30, 60 et 75 JAS (Jours après semis).

(D) Pourcentage en eau dans les rosettes cultivées sur 10mM de nitrate et prélevées à 30, 60 et 75 JAS (Jours après semis).

Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de 3 plantes.

Les astérisques (*) indiquent la date à partir de laquelle une différence significative est observée entre le mutant et le sauvage. La couleur de l'astérisque respecte celle du mutant concerné.

■ Col ■ *atg5* ■ *atg9* ■ RNAi-18

B. Diagnostic métabolique des mutants d'autophagie

Dans la sous partie précédente, nous apportons des éléments permettant de montrer que les mutants d'autophagie sont affectés dans la remobilisation de l'azote de la rosette vers les graines. Cette partie s'intéresse aux perturbations métaboliques associées à ce défaut de remobilisation. Pour cela, nous caractériserons dans un premier temps les modifications de biomasse. Ensuite, nous nous intéresserons aux statuts azotés et carbonés et aux diagnostics métabolique, enzymatique et transcriptomique des mutants.

1. Biomasse

Un des phénotypes visibles des mutants d'autophagie est leur taille, plus petite que celle du sauvage. La figure 25A présente l'évolution de la masse fraîche d'une rosette au cours du développement sur 2mM. Ces résultats montrent clairement que la masse d'une rosette d'*atg5* est plus faible que celle du sauvage dont elle se différencie dès 35 jours après semis (JAS). La croissance d'*atg5* apparaît également plus lente que celle du sauvage. Entre 50 et 60JAS, *atg9* et RNAi-18 possèdent des masses fraîches intermédiaires entre celles du sauvage et celles d'*atg5*. A ce moment, seule la différence entre *atg9* et le sauvage est significativement différente. A 65JAS, la courbe d'évolution des masses fraîches de Col croise celle d'*atg9* et RNAi-18 pour une raison non expliquée. Ce croisement montre un ralentissement du taux de croissance du sauvage. Après cette date, le taux de croissance du sauvage augmente de nouveau et la différence entre la masse fraîche de celui-ci et celle des deux mutants *atg9* et RNAi-18 augmente. La figure 25B présente les taux de croissance des rosettes sur 10mM. Comme c'était le cas sur 2mM, les taux de croissance des mutants d'autophagie sont inférieurs à celui du sauvage et les mutants présentent des masses fraîches de rosettes inférieures à celles du sauvage au cours du développement.

Le pourcentage d'eau dans les rosettes est présenté dans les figures 25C et 25D. Aucune différence significative n'est détectée entre les mutants et le sauvage excepté pour *atg5* et uniquement à 60JAS et 75JAS et en condition de limitation en azote. Bien

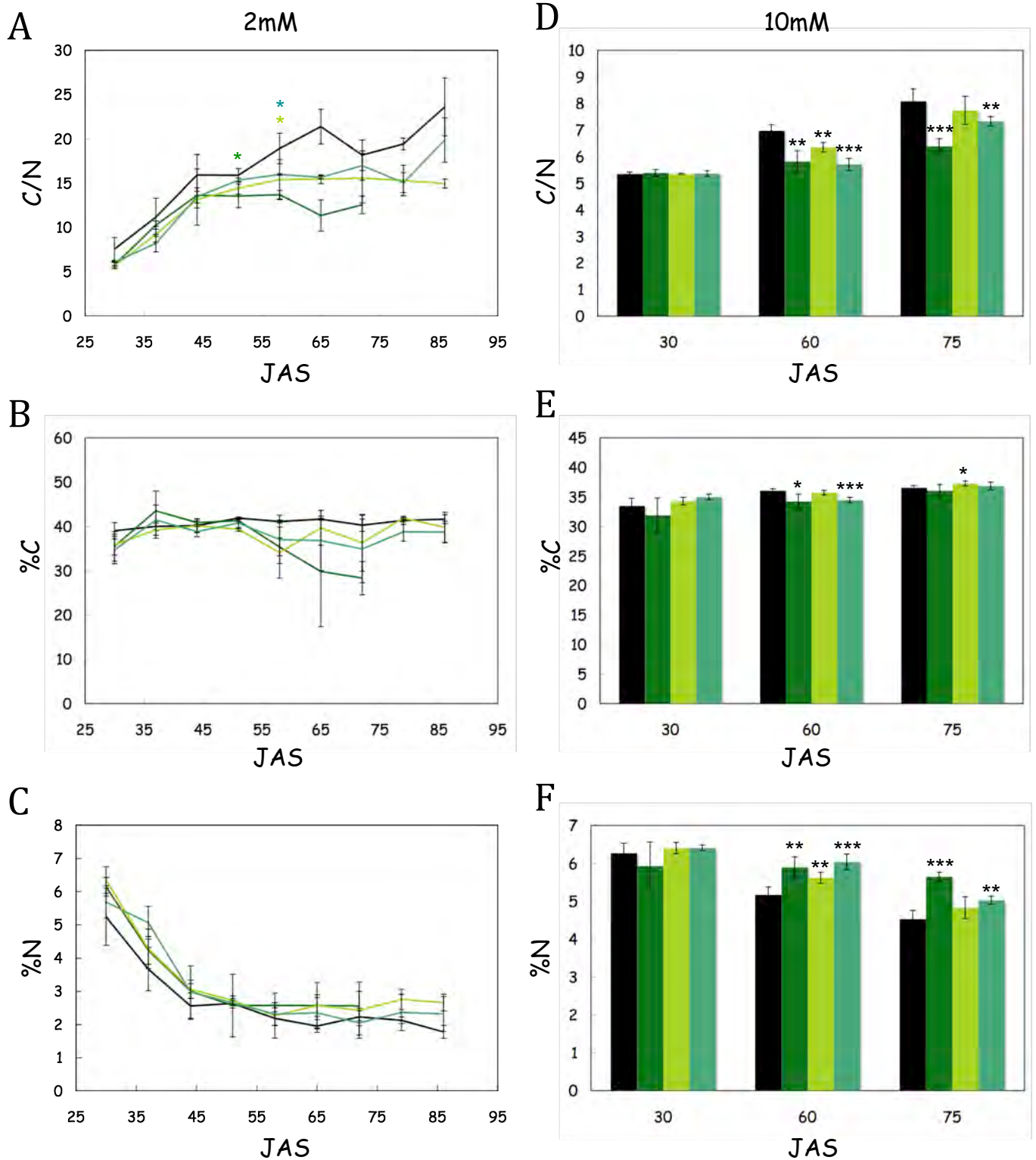


Figure 26. Statut azoté et carboné dans les rosettes des mutants d'autophagie en condition limitante en azote ou en condition pléthorique.

(A) Evolution du rapport C/N au cours du développement sur 2mM de nitrate.

(B) Evolution des concentrations en carbone au cours du développement sur 2mM de nitrate.

(C) Evolution des concentrations en azote au cours du développement sur 2mM de nitrate.

(D) Evolution du rapport C/N au cours du développement sur 10mM de nitrate.

(E) Evolution des concentrations en carbone au cours du développement sur 10mM de nitrate.

(F) Evolution des concentrations en azote au cours du développement sur 10mM de nitrate.

Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de 3 répétitions biologiques d'un pool de 6 à 12 plantes pour 2mM et la moyenne \pm l'écart-type de 3 plantes pour 10mM.

Test de Student : * pour $p < 0,1$; ** pour $p < 0,05$; *** pour $p < 0,01$ ■ Col ■ *atg5* ■ *atg9* ■ RNAi-18

que significative, cette différence ne saurait expliquer les différences de biomasse observées pour *atg5*.

2. Perturbations du rapport C/N

Afin de déterminer les statuts azotés et carbonés des mutants d'autophagie, les concentrations en azote total et en carbone des rosettes cultivées sur 2mM de nitrate ont été mesurées. Les squelettes carbonés issus de la photosynthèse participent à la synthèse des acides aminés après réduction de l'azote inorganique apporté sous forme de nitrate ou d'ammonium. Le rapport C/N constitue alors un bon marqueur permettant d'évaluer l'état physiologique d'une plante et sa capacité d'assimilation du carbone (C) et de l'azote (N). Ce rapport est déterminé par le ratio des concentrations en N et en C. Les rosettes ont été récoltées en cinétique, toutes les semaines à partir de 30 jours après le semis (JAS). L'évolution du rapport C/N en fonction de l'âge de la rosette est représenté figure 26A, B et C pour 2mM. Le C/N des 3 mutants d'autophagie est inférieur par rapport à celui du sauvage Col, à partir de 45 JAS pour le mutant *atg5*, date à laquelle il présente un début de sénescence, et 60JAS pour les deux autres mutants *atg9* et RNAi-18. Ces perturbations des rapports C/N s'expliquent surtout par la diminution du pourcentage de carbone chez les mutants d'autophagie par rapport au sauvage (Figure 26B, %C). Les concentrations en azote apparaissent faiblement supérieures chez les mutants d'autophagie par rapport au sauvage mais ces différences ne sont pas significatives (Figure 26C, %N). Néanmoins, une autre mesure réalisée sur une nouvelle expérimentation montre cette fois une augmentation significative de la concentration en azote après 60 jours de culture dans les rosettes du mutant *atg5* par rapport au sauvage sur 2mM (Annexe 3).

Le rapport C/N ainsi que les concentrations en azote et en carbone ont également été dosés sur des rosettes cultivées sur 10mM de nitrate (Figures 26D, E et F). De la même manière que pour les plantes cultivées sur 2mM, après 30 jours de culture, les rapports C/N des mutants d'autophagie ne sont pas différents de celui du sauvage. Par contre, ces rapports sont plus faibles chez les mutants d'autophagie après 60 et 75 jours de culture. Cette diminution s'explique d'une part par la diminution des concentrations en carbone (Figure 26E) chez les mutants d'autophagie et d'autre part par l'augmentation des concentrations en azote (Figure 26F).

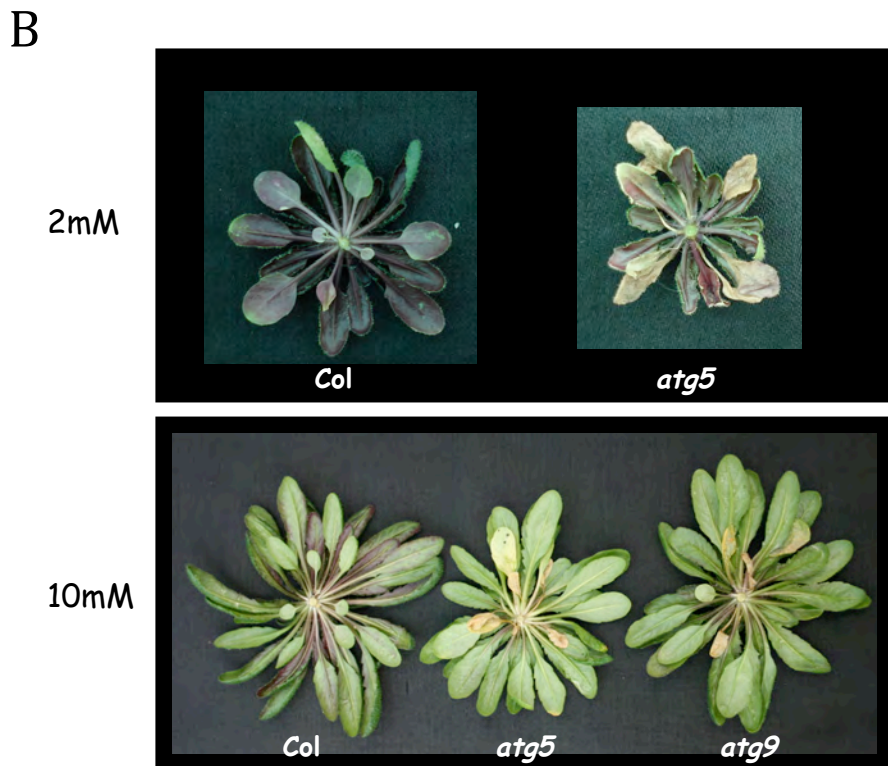
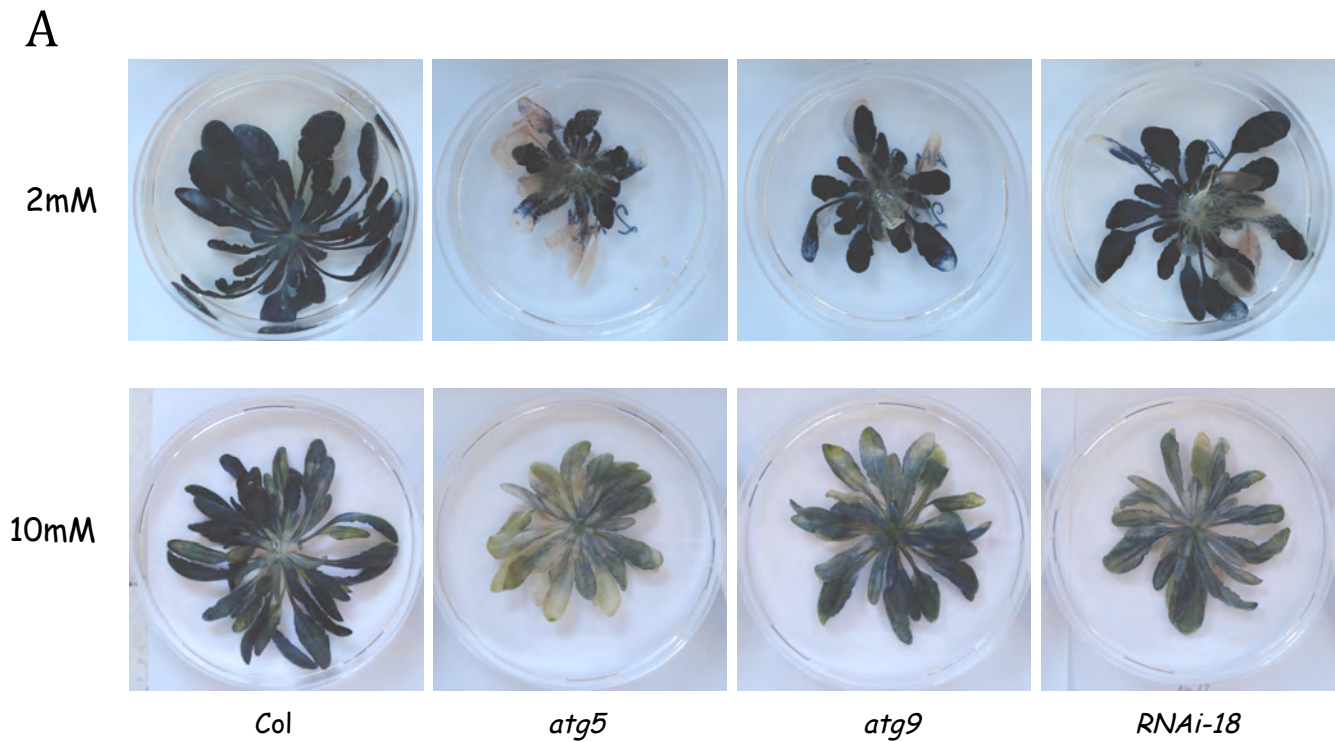


Figure 27. Observations de l'amidon et des anthocyanes chez les mutants d'autophagie.

(A) Coloration de l'amidon au lugol dans les rosettes d'*atg5*, *atg9*, *RNAi-18* et du sauvage cultivés sur 2 et 10mM de nitrate. L'expérience est réalisée à 60JAS. Les photographies ne sont pas à l'échelle entre 2 et 10mM.

(B) Photographies de la face inférieure de rosettes du mutant *atg5* et du sauvage sur 2mM, et des mutants *atg5* et *atg9* ainsi que du sauvage sur 10mM. Les photographies sont prises à 60JAS.

Ces modifications des rapports C/N observées chez des mutants d'autophagie cultivés aussi bien sur 2mM et 10mM de nitrate suggèrent qu'elles sont liées au génotype et indépendantes de la nutrition.

Dans le but de mieux caractériser les différences entre le sauvage et les mutants d'autophagie, la nature des composés carbonés et azotés a été analysée.

En raison du grand nombre d'échantillons prélevés, trois temps de cinétique ont été choisis pour ces analyses. Le temps précoce 30JAS a été choisi car, à cette date, les mutants d'autophagie ne présentent aucune différence de biomasse, de sénescence ni de rapport C/N en comparaison du sauvage. Le temps 60JAS marque l'entrée des trois mutants d'autophagie en sénescence sur 2mM, sénescence observable par le jaunissement des feuilles. A cette même date, le sauvage n'est pas sénéscent. Enfin, après 75 jours de culture, les mutants d'autophagie et le sauvage sont sénescents.

3. Modifications des contenus en métabolites carbonés

3.1. Observations visuelles de l'amidon et des anthocyanes

L'amidon constitue la forme de stockage du carbone chez les végétaux. Une coloration de l'amidon au lugol a été réalisée sur des rosettes cultivées sur 2 et 10mM de nitrate et récoltées à 60JAS. Les plantes ont été prélevées en début de phase diurne (Figure 27A). L'amidon étant stocké dans la plante le jour puis consommé la nuit, il est plus difficile d'observer des différences par coloration au lugol sur des rosettes en fin de journée (Gibon *et al.*, 2004). Les contenus en amidon étant plus faibles en début de phase diurne et les différences d'accumulation et de mobilisation sont plus facilement détectables au lugol. Les plantes cultivées sur 2mM accumulent toutes de l'amidon de façon importante et aucune différence n'est observable entre les génotypes. En revanche, sur les plantes cultivées en 10mM la coloration au lugol permet de différencier les mutants d'autophagie qui ont une couleur bleu clair du sauvage dont la coloration est beaucoup plus foncée, témoignant d'une plus forte accumulation d'amidon chez le sauvage.

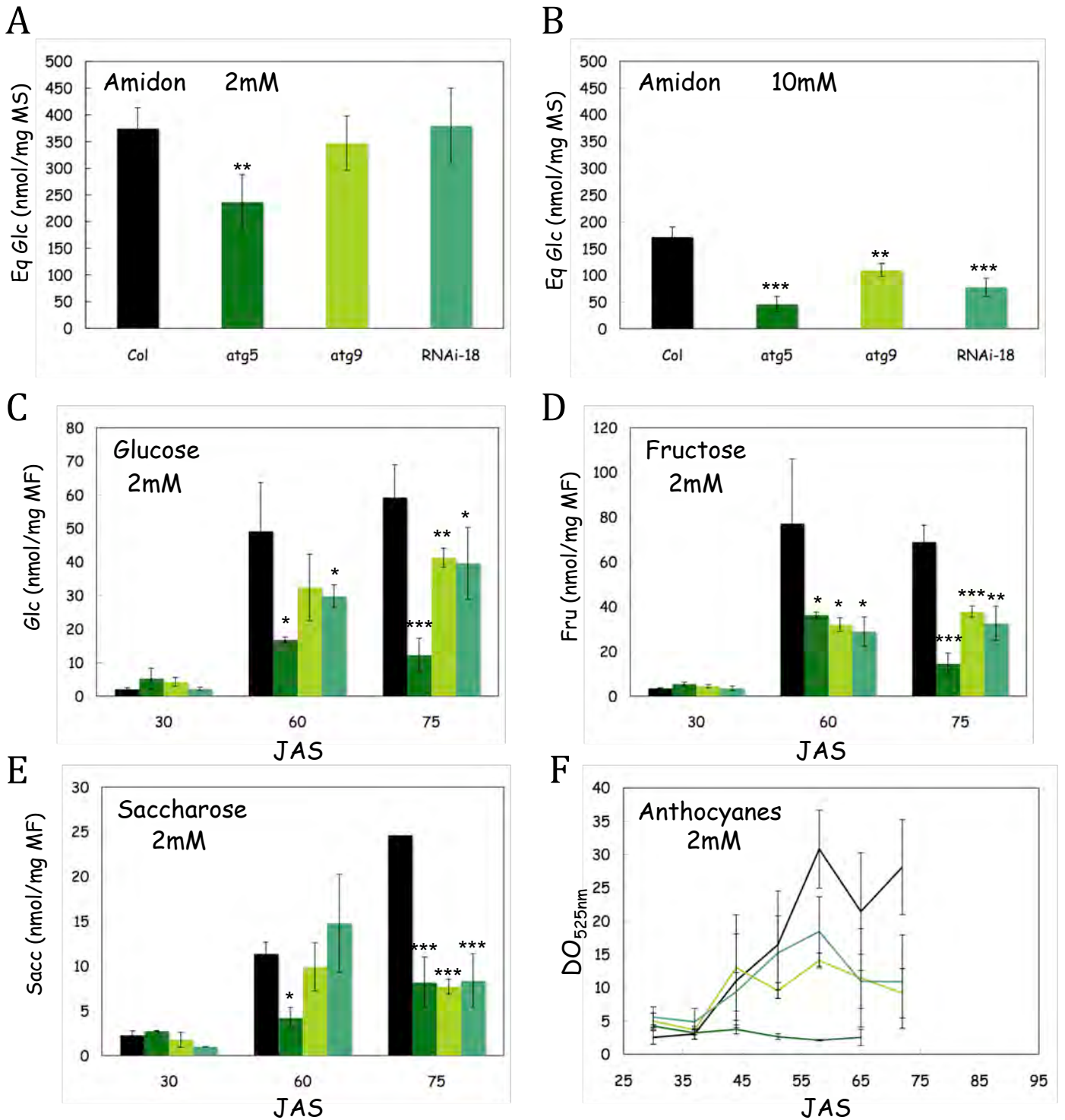


Figure 28. Teneurs en substrats carbonés dans les rosettes des mutants d'autophagie.

(A) Teneur en amidon sur 2mM de nitrate et à 60JAS.

(B) Teneur en amidon sur 10mM de nitrate et à 60JAS.

(C) Concentration en glucose sur 2mM de nitrate et à 30,60 et 75JAS.

(D) Concentration en fructose sur 2mM de nitrate et à 30,60 et 75JAS.

(E) Concentration en saccharose sur 2mM de nitrate et à 30,60 et 75JAS.

(F) Evolution de la teneur en anthocyanes au cours du développement sur 2mM de nitrate.

Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de 3 répétitions biologiques d'un pool de 6 à 12 plantes pour le 2mM de nitrate et la moyenne \pm l'écart-type de 3 plantes pour 10mM de nitrate.

Test de Student : * pour $p < 0,1$; ** pour $p < 0,05$; *** pour $p < 0,01$

■ Col ■ *atg5* ■ *atg9* ■ RNAi-18

Les anthocyanes qui donnent la couleur pourpre aux feuilles sont connus pour s'accumuler en situation de stress notamment en situation de limitation ou de carence azotées. Ils s'accumulent également lorsque les plantes sont riches en carbone par exemple sous l'effet d'un apport exogène de sucre (Do & Cormier, 1991; Rajendran *et al.*, 1992; Bonguebartelsman & Phillips, 1995; Lillo *et al.*, 2008). Les anthocyanes pourraient représenter une réserve en carbone substantielle pour la plante. De façon intéressante, nous avons remarqué que les mutants d'autophagie cultivés sur 2mM mais aussi sur 10mM de nitrate accumulent peu d'anthocyanes par rapport au sauvage (Figure YB). Les photographies prises sur la face inférieure des rosettes des mutants *atg5* et *atg9* en 10mM et *atg5* en 2mM de nitrate montrent bien une diminution, voire une absence de la coloration pourpre par rapport au sauvage.

Les colorations au lugol et l'observation du rougissement dû aux anthocyanes sont cohérents avec le statut carboné des mutants d'autophagie observé précédemment figure 27B et E, à savoir un pourcentage en carbone plus faible chez les mutants.

A la suite de ces observations, les concentrations en sucres solubles et insolubles ainsi qu'en anthocyanes ont été dosées par des méthodes enzymatiques et spectrophotométriques.

3.2. Dosage des sucres solubles, des sucres insolubles et des anthocyanes

Le dosage enzymatique réalisé à 60JAS permet de révéler qu'à 2mM de nitrate, *atg5* présente une diminution de sa teneur en amidon de 40%, ce que n'avait pas permis la coloration au lugol (Figure 28A). Cultivés sur 10mM de nitrate, les trois mutants d'autophagie *atg5*, *atg9* et RNAi-18 contiennent moins d'amidon que le sauvage (Figure 28B). Ce dosage confirme donc les observations faites par coloration et montre que les mutants d'autophagie sont appauvris en sucres insolubles.

Les teneurs en glucose, fructose et saccharose ont alors été mesurées dans les rosettes des mutants cultivés sur 2mM de nitrate et récoltées après 30,60 et 75JAS (Figures 28C,D et E). A 30 jours après le semis, les concentrations en glucose, fructose et saccharose des mutants d'autophagie ne sont pas différentes de celles du sauvage. A 60 jours après semis, les trois mutants d'autophagie contiennent moins de glucose et de fructose que le sauvage. Pour *atg5*, les concentrations en saccharose sont également

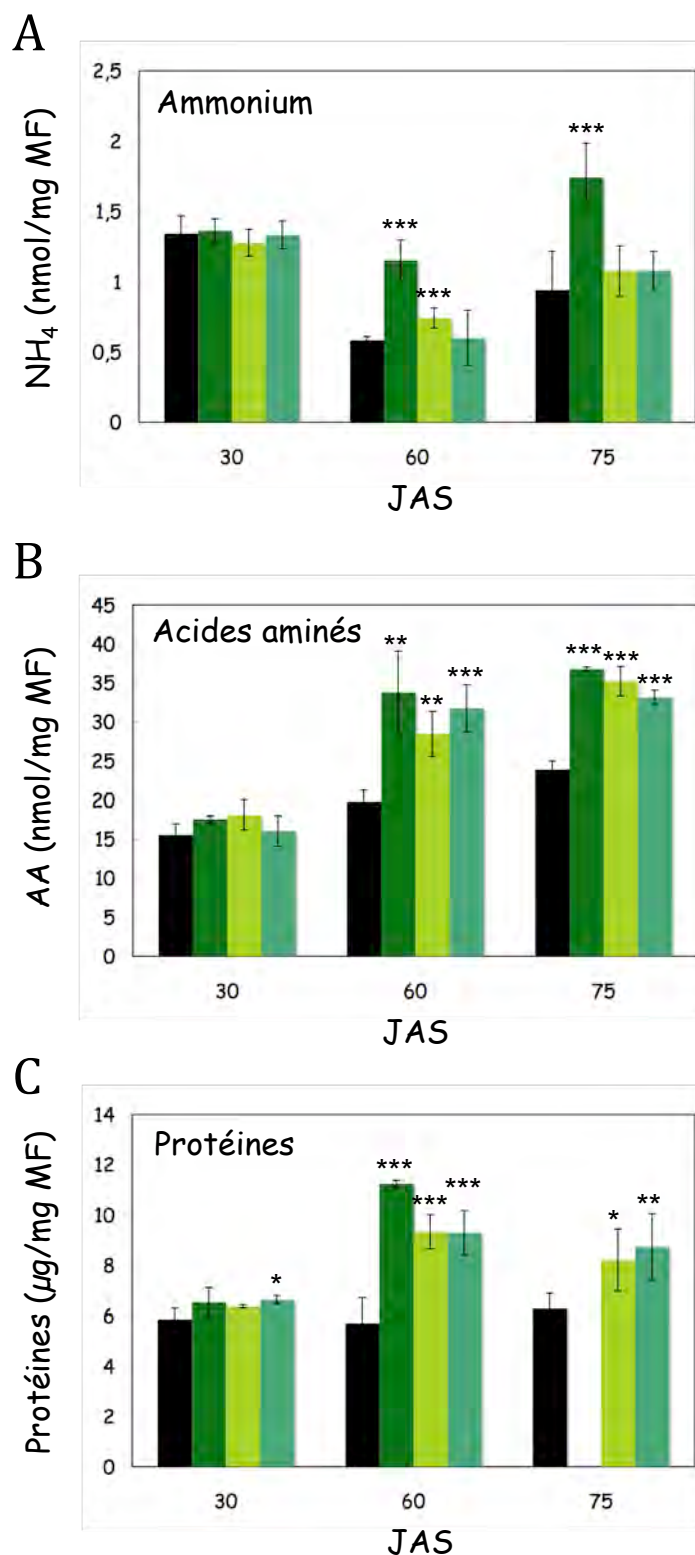


Figure 29. Concentrations en composés azotés dans les rosettes des mutants d'autophagie.

Les plantes ont été cultivées sur 2mM de nitrate et les rosettes prélevées à 30, 60 et 75JAS.

(A) Concentration en ammonium.

(B) Concentration en acides aminés.

(C) Concentration en protéines.

Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de 3 répétitions biologiques d'un pool de 6 à 12 plantes.

Test de Student : * pour $p < 0,1$; ** pour $p < 0,05$; *** pour $p < 0,01$

■ Col ■ *atg5* ■ *atg9* ■ RNAi-18

moindres que celles du sauvage. A 75JAS, les trois mutants *atg* présentent des teneurs en glucose, fructose et saccharose significativement plus faibles que celles du sauvage.

Le dosage des anthocyanes par spectrométrie permet également de confirmer les observations visuelles. Les DO mesurées à 525nm sur des extraits au méthanol à pH acide montrent que les concentrations en anthocyanes des mutants *atg* sont moins élevées que celles de la plante sauvage (Figure 28F).

L'ensemble de ces résultats montre que la perturbation du rapport C/N s'accompagne d'un déficit en sucres et en anthocyanes chez les mutants d'autophagie. L'origine de ces perturbations pourrait provenir d'un défaut dans la biosynthèse ou le stockage de ces composés ou bien d'un défaut en amont, dans la fixation du CO₂ par la photosynthèse.

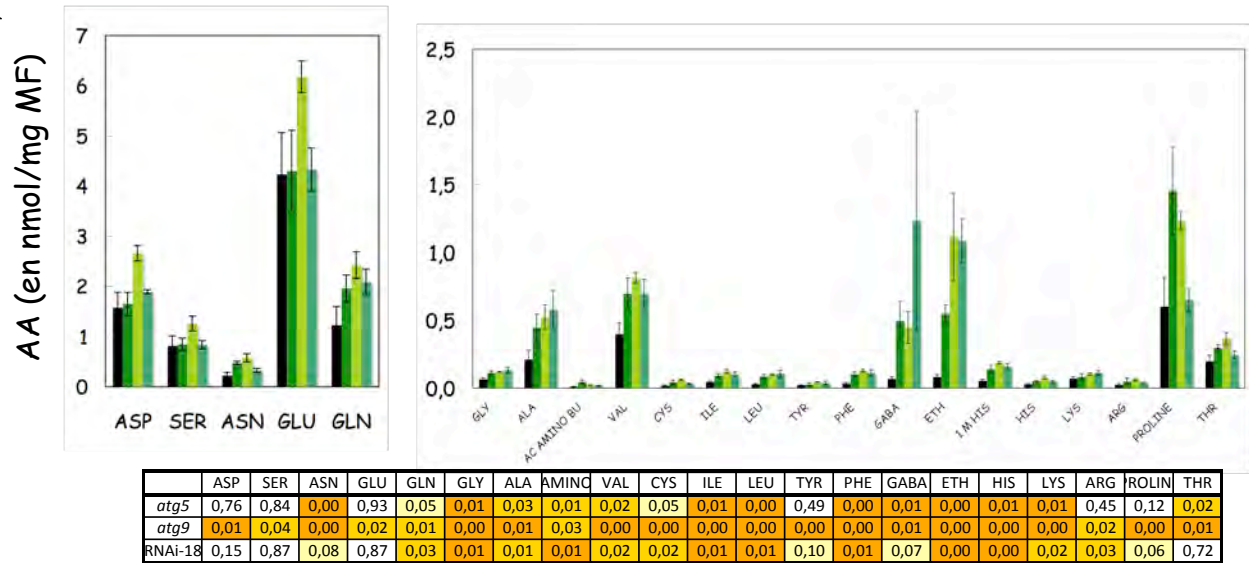
4. Dosage des différents composés azotés

Après nous être intéressés à l'origine du déficit en substrats carbonés, intéressons-nous au métabolisme azoté de ces mutants. Les acides aminés et l'ammonium, les protéines et les acides ribonucléiques représentent des pools d'azote substantiels pour la cellule. Chacun de ces composés a été dosé afin de déterminer les perturbations du métabolisme azoté chez les mutants d'autophagie.

4.1. Acides aminés et ammonium

L'ammonium provient de la réduction du nitrate, de son absorption directe ou du catabolisme des acides aminés. Il entre, par le cycle GS/GOGAT dans la synthèse des premiers acides aminés : glutamine et glutamate. La figure 29A montre que les teneurs en ammonium foliaire sont semblables entre les mutants d'autophagie *atg5*, *atg9* et *RNAi-18* et le sauvage après 30 jours de culture. Après 60 jours de culture, *atg5* et *atg9* accumulent significativement plus d'ammonium que le sauvage dans leur rosette et à 75 jours de culture, seul *atg5* présente une augmentation significative de sa teneur en ammonium par rapport au sauvage. L'ammonium en excès peut alors servir pour la synthèse des acides aminés.

A



B

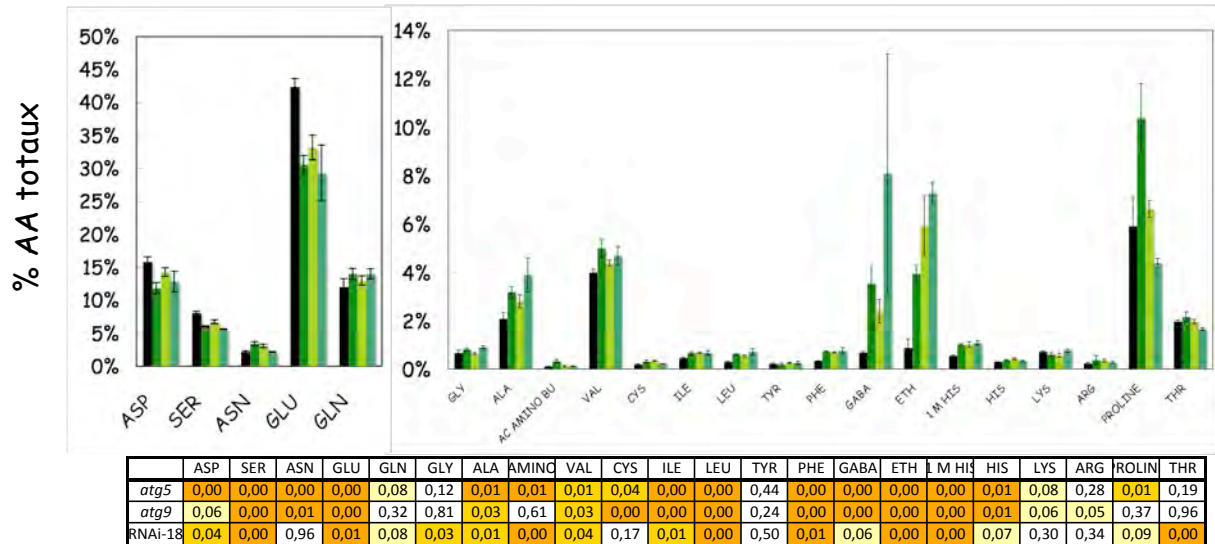


Figure 30. Proportions en acides aminés chez les mutants d'autophagie.

Les plantes ont été cultivées sur 2mM de nitrate et les rosettes prélevées à 60JAS.

(A) Concentration des différents acides aminés exprimée en nmol par mg de matière fraîche.

(B) La proportion des différents acides aminés est exprimée en fonction du total des acides aminés.

Les résultats représentent la moyenne ± l'écart-type de 3 répétitions biologiques d'un pool de 6 à 12 plantes.

Les tableaux situés sous chaque graphique représentent les p-values des tests de Student.

Pour p<0,1 □ ; pour p<0,05 ■ ; pour p<0,01 ■

■ Col ■ *atg5* ■ *atg9* ■ RNAi-18

Les acides aminés, constituants élémentaires des protéines, sont des sources d'azote qui peuvent s'accumuler et qui sont la principale forme de transport de l'azote dans la plante. Les concentrations en acides aminés totaux ont été mesurées dans des rosettes à 30, 60 et 75JAS sur 2mM (Figure 29B). A 30JAS, la concentration en acides aminés est similaire pour les trois mutants et le sauvage. A 60 et 75JAS, les concentrations en acides aminés sont nettement plus élevées dans les rosettes mutantes que dans les sauvages. Les mutants d'autophagie contiennent donc jusqu'à deux fois plus d'acides aminés que le sauvage. Afin de déterminer quels sont les acides aminés préférentiellement accumulés chez les mutants d'autophagie, chaque acide aminé a été dosé dans les rosettes des mutants *atg* et dans celles du sauvage sur 2mM et à 60JAS par HPLC et détection à la ninhydrine (JEOL AminoTaq). Les résultats, exprimés en nmol par mg de MF, confirment que de façon générale les mutants d'autophagie accumulent plus d'acides aminés que le sauvage (Figure 30A). Les acides aminés majoritaires sont présentés séparément (panneau de gauche) des acides aminés minoritaires (panneau de droite). Tous les acides aminés, majoritaires et minoritaires, s'accumulent préférentiellement dans les trois mutants *atg5*, *atg9* et RNAi-18 à l'exception de la sérine, du glutamate et de l'aspartate qui ne s'accumulent que dans *atg9*, et de la proline qui ne s'accumule pas dans RNAi-18. Afin de regarder plus précisément les effets des mutations sur le métabolisme des acides aminés, les proportions de chaque acide aminé ont été considérées (Figure 30B). Cette nouvelle forme de représentation montre que globalement tous les mutants *atg* ont en proportion un déficit en glutamate, en aspartate et en sérine par rapport au sauvage. En revanche, leurs proportions en acides aminés hydrophobes comme la glycine, l'alanine, la valine, l'isoleucine, la leucine, la phénylalanine et la proline sont largement supérieures (Figure 30B). Le glutamate et l'aspartate produit directement par transamination du glutamate, semblent être épuisés dans les mutants, peut être du fait de la production des autres acides aminés. La voie de l'aspartate est impliquée dans la synthèse de la lysine, de la thréonine et de la méthionine, la voie du pyruvate fournit par transamination à partir du glutamate de la valine, de l'isoleucine et de la leucine (Mifflin & Lea, 1982). La diminution des proportions d'aspartate et de glutamate pourraient provenir d'un approvisionnement des pools de valine, d'isoleucine et de leucine ainsi que de valine et proline. La baisse de la proportion en glutamate pourrait également s'expliquer par l'augmentation du GABA. Le GABA est le produit direct issu de la réaction catalysée par la glutamate

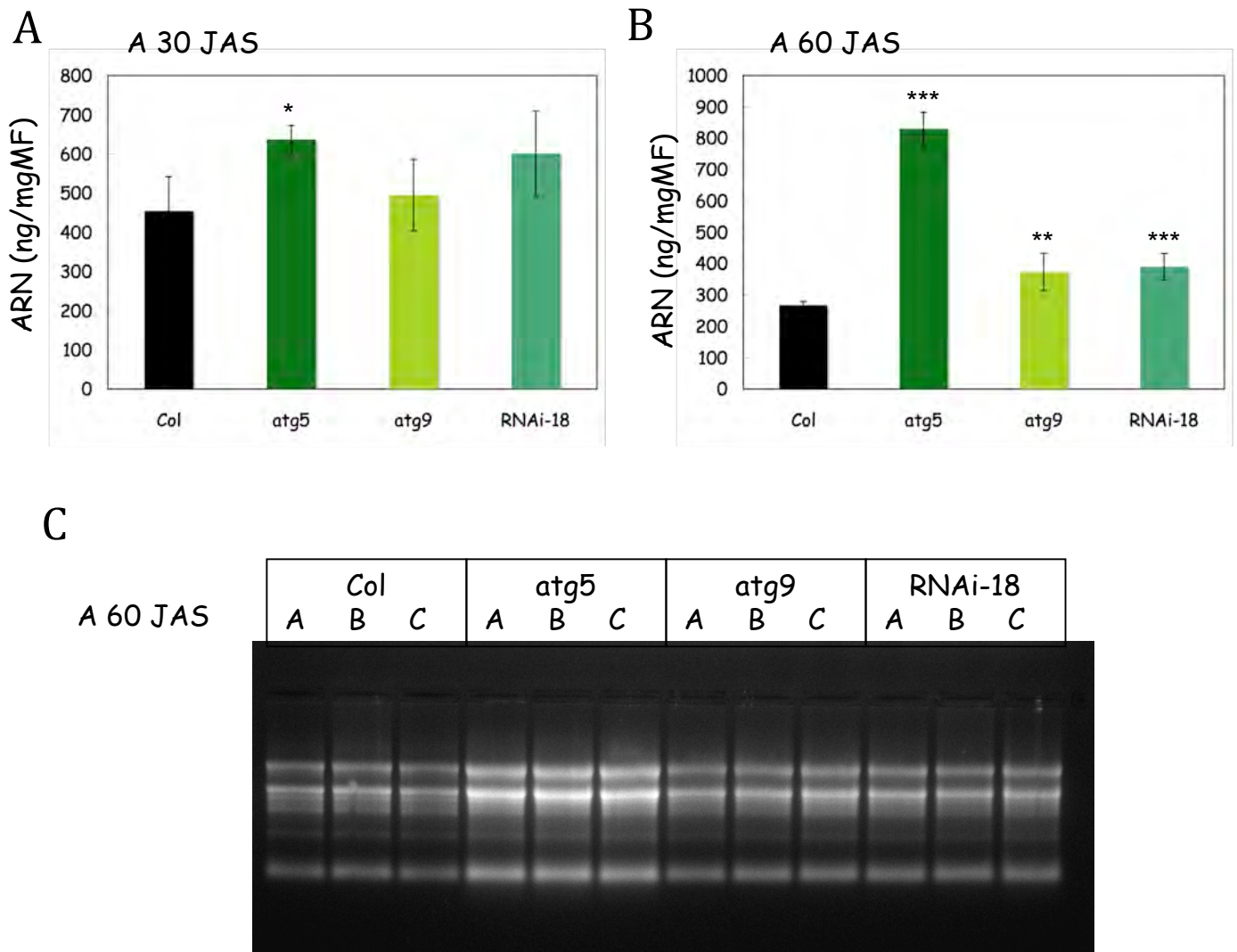


Figure 31. Contenus en ARNs des mutants d'autophagie.

(A) Concentration en ARN en ng/mg de matière fraîche chez les mutants *atg* et le sauvage cultivés sur 2mM de nitrate et à 30J AS. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de 3 répétitions biologiques d'un pool de 6 à 12 plantes.

(B) Concentration en ARN en ng/mg de matière fraîche chez les mutants *atg* et le sauvage cultivés sur 2mM de nitrate et à 60J AS. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de 3 répétitions biologiques d'un pool de 6 à 12 plantes.

Test de Student : * pour $p < 0,1$; ** pour $p < 0,05$; *** pour $p < 0,01$

(C) Gel d'ARN présentant le contenu en ARN dans les rosettes des mutants *atg* et du sauvage à 60JAS. Les extraits réalisés sur un poids égal de MF sont déposés à volume égal.

décarboxylase. L'accumulation du GABA est souvent observée dans des situations de stress. Le GABA pourrait également comme la proline et l'arginine être un composé de stockage transitoire de l'azote. La dégradation du GABA pourrait aussi avoir un rôle anaplérotique dans la fourniture de succinate au cycle de Krebs (Kinnersley & Turano, 2000). Enfin l'augmentation des ratios glycine/sérine dans les mutants d'autophagie suggèrent un défaut au niveau de la photorespiration qui mériterait d'être confirmé par échanges gazeux.

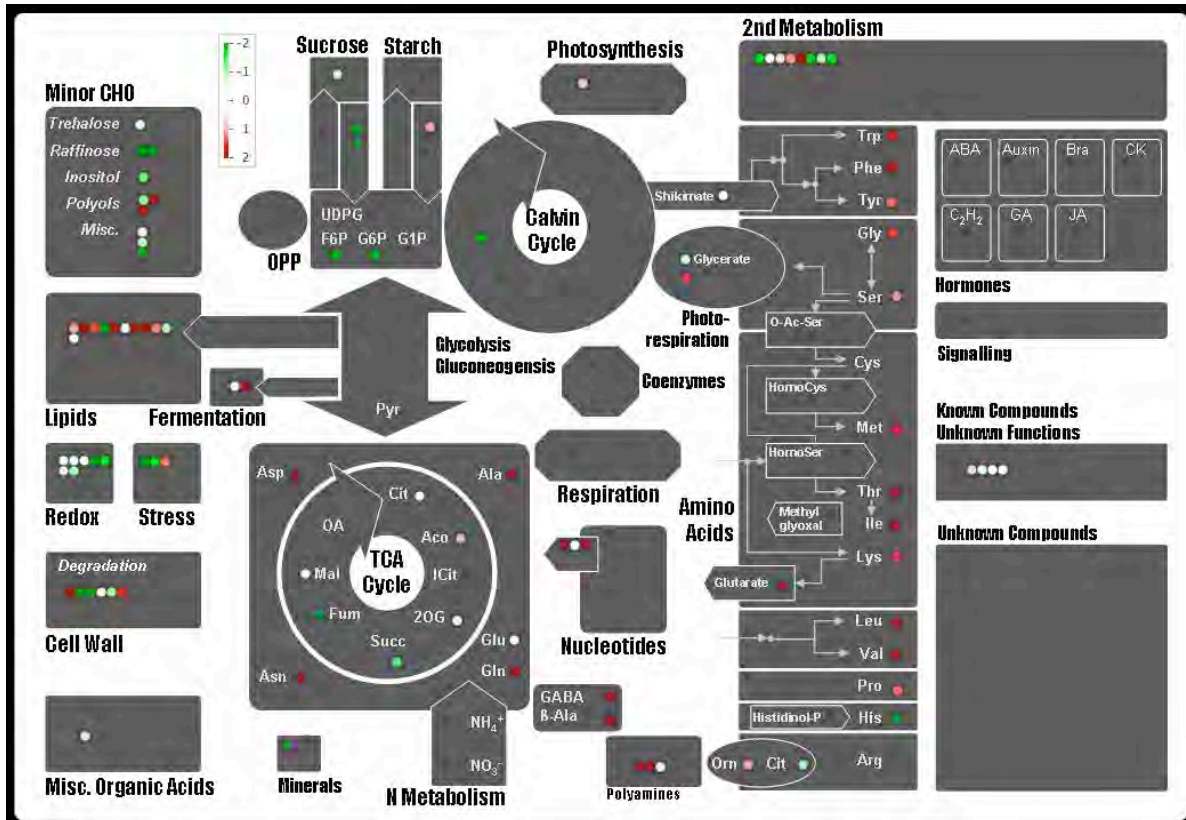
4.2. Protéines

Les protéines sont la source d'azote majoritaire dans la cellule. Leur synthèse dépend de celle des acides aminés et leur dégradation est tributaire des mécanismes de remobilisation de l'azote. Les concentrations en protéines solubles dans les rosettes de plantes prélevées à 30, 60 et 75JAS sur 2mM ont été dosées. La figure 29C montre qu'à 30JAS, les concentrations en protéines solubles des mutants *atg* sont comparables à celle du sauvage. A 60 et 75JAS, les trois mutants d'autophagie *atg5*, *atg9* et *RNAi-18* accumulent de façon importante les protéines solubles dans leurs feuilles par rapport au sauvage. Le déficit d'activité autophagique semble être responsable d'une accumulation des protéines foliaires.

4.3. ARNs

Les acides ribonucléiques contiennent une base azotée et peuvent constituer une source d'azote non négligeable pour la remobilisation. En effet, l'un des symptômes de la sénescence est la diminution de la concentration en ARN (Krupinska & Humbeck, 2008). Les ARNs ont été extraits à volume égal à partir d'un poids égal de rosettes fraîches cultivées sur 2mM de nitrate et prélevées après 30 et 60 jours de culture. Ces ARNs ont ensuite été déposés sur gel à volume égal (donc à mg de matière fraîche égal) afin de mettre en évidence des différences éventuelles dans les profils en ARNr entre mutants et sauvage. Le dosage des ARNs réalisés au Nanodrop montre que seul *atg5* contient significativement plus d'ARNs à 30JAS (Figure 31A). A 60JAS, les trois mutants *atg5*, *atg9* et *RNAi-18* sont significativement plus riches en ARNs que le sauvage (Figure 31B).

A



B

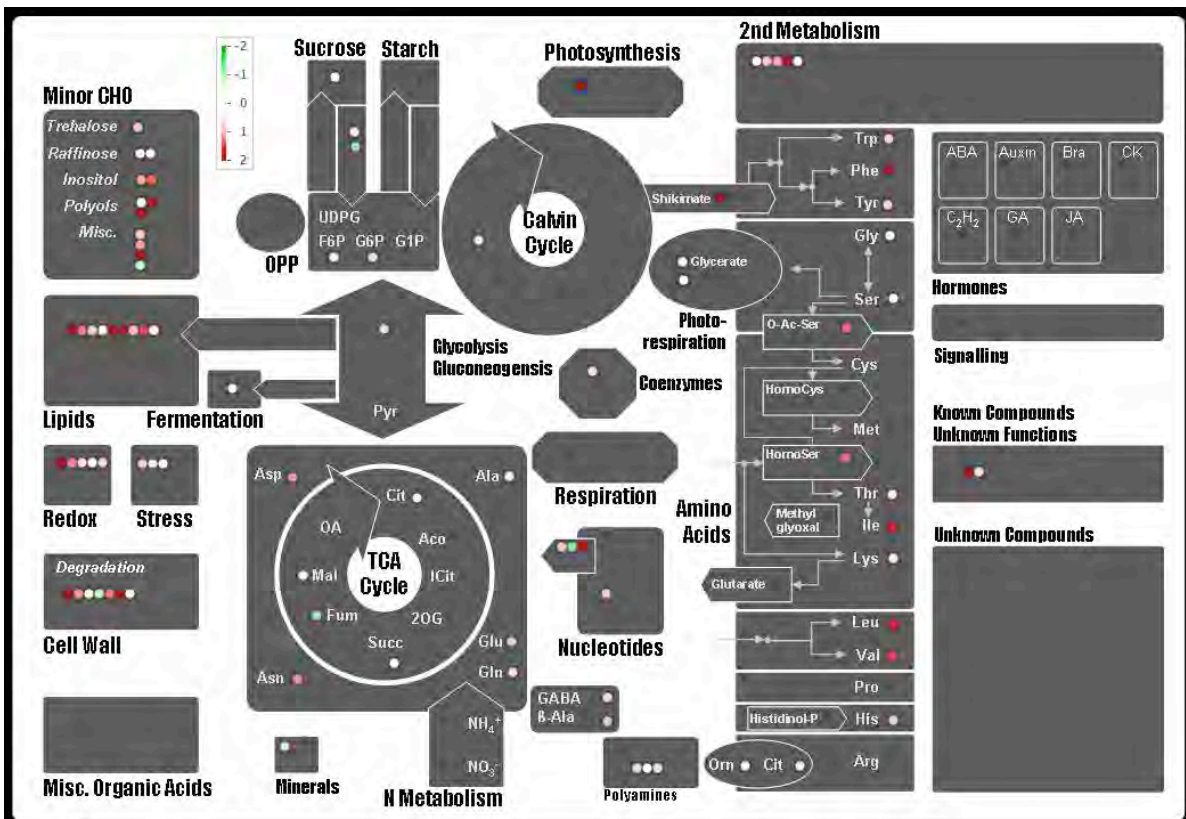


Figure 32. Représentations Mapman des contenus métaboliques du mutant *atg5* par rapport au sauvage.

(A) Représentation Mapman de la comparaison du contenu en métabolites d'*atg5* par rapport au sauvage sur 2mM et à 60JAS lors d'une première expérimentation.

(B) Représentation Mapman de la comparaison du contenu en métabolites d'*atg5* par rapport au sauvage sur 2mM et à 60JAS lors d'une deuxième expérimentation.

Les gels d'ARN permettent essentiellement de visualiser les ARN ribosomiaux. Ces gels montrent très clairement une accumulation de ces ARNr chez les mutants d'autophagie (Figure 31C). Les ARNr sont représentatifs de la quantité de ribosomes, une autre source d'azote non négligeable. Les ribosomes sont présents dans différents compartiments cellulaires comme le cytosol ou les chloroplastes. Afin de savoir si un type d'ARNr particulier (28S, 18S, 5S ou chloroplastique) était préférentiellement accumulé, les données des puces Agilent réalisées préalablement à la préparation des sondes en vue de l'analyse transcriptomique par Affymetrix ont été utilisées afin d'obtenir une quantification des différents ARNr. Aucune différence claire n'a pu être mise en évidence et il semble que le profil en ARNr soit identique entre mutants et sauvage. Ainsi, un défaut d'activité autophagique ne semble pas entraîner d'accumulation préférentielle de certaines populations d'ARNr.

5. Métabolome

Afin de déterminer, de façon plus globale, les effets de l'autophagie sur le métabolisme, une analyse métabolique a été réalisée. Les métabolites, composés organiques de petite taille, ont été quantifiés grâce à la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie gazeuse au sein de la plateforme de chimie du végétal située sur le site de l'INRA de Versailles. La liste des métabolites identifiés à ce jour n'est évidemment pas exhaustive, mais renseigne déjà sur le profil métabolique des mutants étudiés. Cette expérience permet de cibler les voies métaboliques affectées par la déficience dans le processus d'autophagie. L'étude a été menée sur deux cultures indépendantes. Pour la première culture, les rosettes prélevées après 30, 60 et 75 jours de culture sur 2mM ont été analysées. Pour la seconde culture, les rosettes prélevées après 30, 60 et 75 jours de culture sur 2 et 10mM ont été analysées.

Les profils métaboliques des mutants d'autophagie varient peu par rapport à ceux du sauvage après 30 jours de culture (Annexe 4).

Par contre, après 60 jours de culture sur 2mM, les profils métaboliques des mutants d'autophagie, surtout *atg5*, divergent de celui du sauvage (Figure 32). En effet, les représentations Mapman des voies métaboliques montrent de nombreuses différences. La figure 32A présente la comparaison du mutant *atg5* par rapport au sauvage après 60

	JAS	2mM			10mM		
		30	60	75	30	60	75
SUCRES	Glucose-6-P			1,31			
	Fructose-6-P			1,22			
	Mannose			0,51		0,63	
	Melezitose			0,35			
	Fructose			0,34		0,63	
	Sucrose	1,45				1,29	
	Shikimate	1,37	5,62	4,01	1,24		
	Xylose	0,76	2,13		0,80	0,73	
	Trehalose		1,85	4,31	0,79		
	Hexose-P						2,88
	Melibiose				4,45	0,38	0,19
	Glucose		0,45	0,19		0,26	0,16
LIPIDES	Glycerol		5,39	3,04			
	Glycerol-3-P		2,78	2,26			
	Linoleic acid		1,89	2,10			
	Campesterol		2,08	2,10			
	beta-Sitosterol		1,78	1,64			
	Galactosylglycerol		2,57	0,62			
	Stigmasterol		34,32	24,46			16,30
	Ethanolamine		6,00	2,31			2,05
	Tryptophan		1,72				
	Tyrosine		1,69				
ACIDES AMINES	Glutamine				1,14		
	Urea						5,58
	Leucine		3,32	1,92			5,05
	Isoleucine		3,11	1,76			3,33
	beta-Alanine						3,15
	Phenylalanine		4,00	1,92			3,08
	Valine		2,77	1,51			2,66
	GABA					1,66	2,10
	Alanine						1,86
	Asparagine				1,24		1,68
	Glutamate	1,32	1,78	1,54	1,24		1,62
	Threonine	1,10					1,57
	Aspartate		2,25	1,93			1,57
	Pyroglutamate		1,65	1,48	1,28		1,54
	Homoserine		2,44	3,09			
	O-Acetyl-serine		2,55	2,22	1,36		
	2-hydroxyglutarate	2,73	5,51	2,77			1,35
	Succinate	1,47					2,97
CYCLE DE KREBS	Pyruvate			1,49			
	Citrate				1,83		
	Malate	1,30		0,55	1,33		
	2-Oxoglutarate		1,86	1,87			2,09
	Fumarate		0,45				0,64
NUCLEOTIDES	Guanine			9,88			
	Urate	0,55			0,48		
	Allantoin		75,37				2,09
PAROI CELLULAIRE	Ribose		11,22	3,73	1,20		9,92
	Galacturonate		12,25				2,23
	Ribonate	1,43	2,22	1,28	1,37		1,31
	Arabinose		2,47				1,26
	Galactose			0,16		0,33	0,21
STRESS	Salicylate		6,17	4,47			
	Dehydroascorbate			0,55		0,79	
	alpha-Tocopherol			0,33			
	Pipicolate		12,13				4,24
Raffinose	2,95						
COMPOSES MINEURS	Sorbitol			11,21			
	Inositol-1-P		2,54	1,78			
	Galactonate			1,68			
	Galactinol	2,19		0,56		0,59	
	Inositol	1,23	2,07		1,16	0,82	
	Arabitol		527,55	103,02			687,16
	Mannitol		244,98	96,95			39,86
Erythritol						25,45	
PHOTOSYNTHESE REDOX	Phytol		140,71	25,27			
	Glucarate			2,30			
AUTRES	Threonate	1,49	4,55	3,01			
	Spermidine			0,39			
	Putrescine				0,63		
	Oleamide		3,36				
	beta-Lactate	4,18	11,47				
	beta-Indole-3-acetonitrile		3,11				
	Nicotinrile		1,50				
	Nicotinate	0,73	1,47				
	Maleate		0,69				
	1,3-diaminopropane						
	Glucuronate		153,90	16,36			
	Malonate		8,38	5,09			
	Pentadecanoate		2,04	2,65			
	pentanenitrile						
	S-methylthio				2,50		
	Tetracosanoate		2,32	2,17			
	Phosphate			0,51			
	Sinapinate-cis				1,51		
Erythronate	1,43		0,61	1,33			
Lactobionate		23,33	3,70			11,64	
2-Amino adipate		5,11	3,51			6,59	
Palmitelaidate						2,73	
2,4diOHbutanoate		7,10	2,91			2,15	

Figure 33. Tableau représentant la liste des métabolites dont le contenu varie dans le mutant *atg5* par rapport au sauvage.

Les métabolites sont rangés par classe. Les résultats correspondent au rapport *atg5*/Col des moyennes de trois répétitions biologiques. Lorsque le rapport est inférieur à 1 (en vert), cela signifie que le métabolite s'accumule dans le sauvage par rapport à *atg5*. A l'inverse, si le rapport est supérieur à 1 (en rose), cela signifie que le métabolite s'accumule dans *atg5* par rapport au sauvage.

jours de culture sur faible azote. La figure 32B représente une répétition des mêmes comparaisons que la figure 32A. Avec ces deux comparaisons, nous avons voulu mettre en évidence les points communs à savoir les changements métaboliques propres à un déficit dans le processus d'autophagie et non dû aux variations éventuelles provoquées par les biais de culture et d'expérimentation. Le profil métabolique obtenu lors de la première expérimentation est beaucoup plus contrasté que celui obtenu lors de la seconde.

Une accumulation des acides aminés et des lipides chez *atg5* est observée dans les deux expérimentations. A l'inverse, les teneurs en sucres et en fumarate, un intermédiaire du cycle de Krebs, diminuent.

Afin de déterminer si ces modifications observées chez *atg5* à 60JAS sur 2mM se retrouvent d'une part à 75JAS et d'autre part à 10mM de nitrate, les métabolites différentiellement accumulés (au cours de la deuxième expérience) ont été classés par groupe et le rapport *atg5/Col* rapporté dans la figure 33. Si le rapport est inférieur à 1, cela signifie que le métabolite est moins abondant dans *atg5* que dans Col. A l'inverse, si le rapport est supérieur à 1, le métabolite s'accumule dans *atg5* par rapport au sauvage.

Le déficit en sucres observé surtout lors de la première expérimentation à 60JAS est très visible à 75JAS. Ce déficit semble être exacerbé sur 10mM. L'accumulation de lipides observée à 60JAS reste similaire à 75JAS. Néanmoins, cette accumulation n'est pas observée sur 10mM, excepté pour le stigmastérol et l'éthanolamine qui s'accumulent à 75JAS. L'accumulation des acides aminés à 60JAS se retrouve à 75JAS. Il semblerait qu'elle soit différée dans le temps sur 10mM puisque cette accumulation ne s'observe dans cette condition qu'à 75JAS.

Le shikimate et la phénylalanine s'accumulent dans le mutant *atg5*. La phénylalanine provient de la voie du shikimate et constitue un acide aminé très important puisqu'il est le « nœud » de plusieurs voies métaboliques comme la voie des phénylpropanoïdes et la voie de biosynthèse des monolignols (lignines) par exemple. Les lignines, composés extrêmement hydrophobes, imprègnent les parois cellulaires secondaires. De façon intéressante, cette étude métabolique montre une accumulation des composés pariétaux chez le mutant *atg5*. A l'inverse, ils sont déficients en anthocyanes et en composés de la voie des phénylpropanoïdes. Cette diminution des contenus en composés de la voie des phénylpropanoïdes a été observée par Pauline Anne qui les a dosés par LC-MS lors de son stage de Master. Ces observations suggèrent

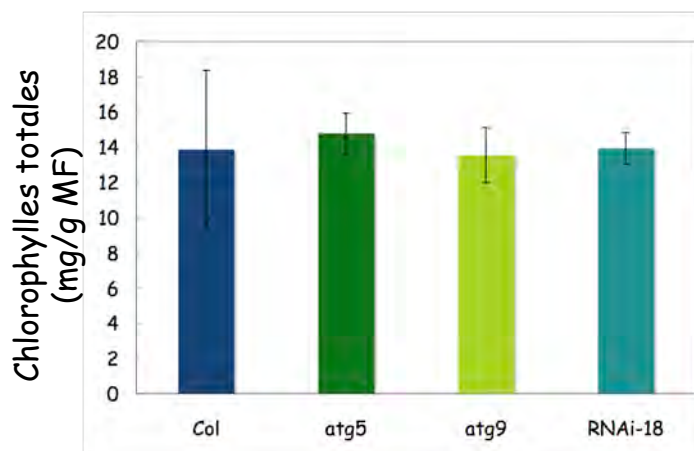


Figure 34. Concentrations en chlorophylles totales chez les mutants d'autophagie.

Les chlorophylles sont dosées dans des rosettes des mutants *atg* et du sauvage sur 2mM et à 60JAS. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de 3 répétitions biologiques d'un pool de 6 à 12 plantes.

Figure 35. Analyse transcriptomique des gènes de la voie du shikimate et de la voie des phénylpropanoïdes.

Liste des gènes de la voie du shikimate et de la voie des phénylpropanoïdes induits ou réprimés dans les rosettes du mutant *atg5* par rapport au sauvage à 60JAS sur 2mM.

L'analyse est réalisée selon la méthode du produit des rangs de Breitling (Breitling *et al.*, 2004).

Les colonnes représentent la moyenne sur deux expériences des rapports des intensités *atg5/Col*.

RP down/up est le rang du « produit des rangs » et indique le rang du gène (de 1 à 22810) dans la liste de gènes sous/sur-exprimés. 1 étant le rang du gène le plus sous/sur-exprimés respectivement pour rank RP down et rank RP up, et 22810 étant le rang du gène le moins sous/sur-exprimés respectivement pour rank RP down et rank RP up.

FDR est le « False Discovery Rate » et donne une idée de la pvalue du rang du produits des rangs. Une FDR inférieure à 10^{-3} a été prise en compte dans nos analyses.

que les produits de la phénylalanine sont « déroutés » vers la voie de biosynthèse des monolignols au détriment de la voie des phénylpropanoïdes.

L'étude métabolique révèle par ailleurs un déficit en α -tocophérol dans le mutant *atg5*. Les tocophérols (vitamine E) sont considérés comme les principaux antioxydants de la phase lipidique des membranes (Triantaphylides & Havaux, 2009). A l'inverse, *atg5* accumule de l'acide salicylique, du pipécolate ainsi que du raffinose. Ces composés sont connus pour être des marqueurs de stress pour la cellule. L'acide pipécolique, composé toxique pour la cellule provenant du catabolisme de la lysine, est connu pour s'accumuler en situation de stress osmotique (Moulin *et al.*, 2006). Ces observations suggèrent que les mutants d'autophagie peinent à gérer les stress.

6. Modifications des activités impliquées dans l'assimilation, le recyclage et le transport du carbone et de l'azote

6.1. Origine de la diminution en composés carbonés.

Dans les paragraphes précédents, il a été montré que les mutants d'autophagie contiennent moins de sucres solubles, moins d'amidon et moins d'anthocyanes. Cette diminution des concentrations en composés carbonés peut provenir d'un défaut dans leur biosynthèse ou encore d'un dysfonctionnement de la photosynthèse. Pour répondre à ces hypothèses, les chlorophylles ont été dosées afin de mettre en évidence éventuellement un défaut dans la photosynthèse.

Les chlorophylles a et b ont été dosées sur des rosettes cultivées sur 2mM et prélevées après 30, 60 et 75 jours de culture (Figure 34). Les concentrations en chlorophylles a et b, ainsi que le rapport des deux, sont similaires chez les mutants d'autophagie et chez le sauvage pour les trois temps d'analyses. Afin d'évaluer précisément l'efficacité de la photosynthèse, il aurait été idéal de mesurer le Fv/Fm au cours du temps et de faire des mesures d'échange gazeux. Cette dernière technologie n'est pas disponible sur le centre et donc assez difficile à mettre en œuvre.

La seconde manière pour déterminer l'origine de la diminution en composés carbonés est d'utiliser les données transcriptomiques. Bien qu'il y ait des modifications post-transcriptionnelles, l'analyse du transcriptome renseigne sur la régulation des

		atg5 vs Col repeat 1	atg5 vs Col repeat 2	Rank RP UP	FDR Up	Rank RP Down	FDR Down
Voie du shikimate							
AT4G39980	DHS1 (3-DEOXY-D-ARABINO-HEP	0,7256	0,5680	19425	0,002997599	4465	0,00098025
AT1G22410	DHS3 2-dehydro-3-deoxyphosph	2,2075	1,9423	2323	0,000719843	20906	0,003623276
AT2G16790	shikimate kinase family protein	2,3945	2,1013	2101	0,000660233	21085	0,003688994
AT1G06890	transporter-related	0,6609	0,6035	19842	0,003092369	4388	0,000971489
AT2G38400	AGT3 (ALANINE:GLYOXYLATE AM	10,0508	2,6895	715	0,000278328	22113	0,004048847
AT3G44720	ADT4 (arogenate dehydratase 4)	2,5707	2,2357	1915	0,00060991	21228	0,003745518
Voie des phénylpropanoïdes							
AT5G04230	PAL3 (PHENYL ALANINE AMMON	0,4452	0,5911	21240	0,003485851	2505	0,000774749
AT1G65060	4CL3; 4-coumarate-CoA ligase	0,4613	0,4861	21605	0,003621002	1823	0,000692333
AT1G20490	4CL AMP-dependent synthetase	0,3197	0,2417	22387	0,0040109	586	0,000379037
AT5G13930	TT4 (TRANSPARENT TESTA 4); na	0,1377	0,5035	22291	0,003951152	602	0,000386403
AT3G55120	TT5 (TRANSPARENT TESTA 5); ch	0,1408	0,4701	22361	0,003995329	555	0,000374887
AT3G51240	TT6 F3H (FLAVANONE 3-HYDROX	0,8734	0,5150	18097	0,002738277	4612	0,000998059
AT5G07990	TT7 (TRANSPARENT TESTA 7); fla	0,1223	0,1094	22758	0,004268418	95	0,000175861
AT5G08640	FLS (FLAVONOL SYNTHASE); flav	0,2542	0,6241	21609	0,003621793	1501	0,000619464
AT5G63580	FLS2 (FLAVONOL SYNTHASE 2); fl	0,3230	0,8940	18005	0,002721903	3881	0,000924297
AT5G63590	FLS3 (FLAVONOL SYNTHASE 3); fl	0,3051	6,1533	3414	0,00093468	5868	0,001140017
AT1G30530	FGT UGT78D1 (UDP-GLUCOSYL T	0,3422	0,6600	21146	0,003453192	2276	0,00074433
at2g22590	FGT transferase, transferring gly	0,1967	2,9080	5745	0,001264236	3830	0,000916483
at5g17030	FGT UGT78D3 (UDP-GLUCOSYL T	0,4946	0,3323	21746	0,003683232	1301	0,000576238
at5g17050	FGT UGT78D2 (UDP-GLUCOSYL T	1,3472	0,4095	13102	0,002038217	4642	0,000999326
at5g42800	TT3 DFR (DIHYDROFLAVONOL 4-F	0,0357	0,2912	22709	0,004222861	67	0,000139631
AT4G22870;AT4	ANS [AT4G22870, leucoanthocya	0,0711	0,2129	22742	0,004249475	111	0,000196479
at5g17050	AGT UGT78D2 (UDP-GLUCOSYL T	1,3472	0,4095	13102	0,002038217	4642	0,000999326
at4g14090	AGT UDP-glucoronosyl/UDP-gluc	0,0256	0,2336	22757	0,004264385	35	0,000113342
at5g54060	AGT UF3GT (udp-glucose:flavono	0,0298	0,1608	22790	0,004310301	27	0,000111112
at3g21560	AGT UGT84A2; UDP-glycosyltrans	0,7053	0,5330	19825	0,003089574	3822	0,000915039
at2g29750	AGT UGT71C1 (UDP-GLUCOSYL T	0,7860	0,3365	19596	0,003031343	2369	0,000757013
at3g29590	AAT AT5MAT; O-malonyltransfer	0,0659	0,2671	22707	0,004221841	126	0,000206229
AT1G03940;AT1	[AT1G03940, transferase family g	0,0381	0,2079	22764	0,004273986	53	0,000129273
at5g17220	GST ATGSTF12 (ARABIDOPSIS TH	0,0175	0,2849	22726	0,004231739	24	9,66437E-05
at1g02940	GSTF5 (GLUTATHIONE S-TRANSFE	0,5800	0,3454	21289	0,00350739	1649	0,00064663
at1g02940	GSTF5 (GLUTATHIONE S-TRANSFE	0,5800	0,3454	21289	0,00350739	1649	0,00064663
AT5G61160	AACT1 (anthocyanin 5-aromatic a	0,0977	0,0246	22794	0,004323094	10	5,6391E-05
Régulateurs de la voie des phénylpropanoïdes							
AT1G56650	PAP1 (PRODUCTION OF ANTHOC	0,0892	0,3173	22656	0,00416575	217	0,000261806
AT4G00730	ANL2 (ANTHOCYANINLESS 2); tra	0,4708	0,6738	20486	0,003261079	3583	0,00088821
AT1G66370	MYB113 (myb domain protein 11	0,6482	0,3509	20818	0,003358796	1905	0,000701556
AT1G66380	MYB114 (myb domain protein 11	0,2666	0,5183	22049	0,003829619	1132	0,000529638
AT4G09820	TT8 (TRANSPARENT TESTA 8); DN	0,0205	0,1741	22786	0,004303889	21	8,84112E-05
AT1G66390	PAP2 MYB90 (MYB DOMAIN PRO	0,0536	0,6509	21744	0,003680755	326	0,000323206

Figure 35. Analyse transcriptomique des gènes de la voie du shikimate et de la voie des phénylpropanoïdes.

Liste des gènes de la voie du shikimate et de la voie des phénylpropanoïdes induits ou réprimés dans les rosettes du mutant *atg5* par rapport au sauvage à 60JAS sur 2mM.

L'analyse est réalisée selon la méthode du produit des rangs de Breitling (Breitling *et al.*, 2004).

Les colonnes représentent les rapports des intensités *atg5*/Col sur deux expériences.

Rank RP down/up est le rang du « produit des rangs » et indique le rang du gène (de 1 à 22810) dans la liste de gènes sous/sur-exprimés. 1 étant le rang du gène le plus sous/sur-exprimés respectivement pour rank RP down et rank RP up, et 22810 étant le rang du gène le moins sous/sur-exprimés respectivement pour rank RP down et rank RP up.

FDR est le « False Discovery Rate » et donne une idée de la pvalue du rang du produits des rangs. Une FDR inférieure à 10^{-3} a été prise en compte dans nos analyses.

■ FDR Up<0,0001 ■ FDR Up<0,001 ■ FDR Down<0,0001 ■ FDR Down<0,001

		atg5 vs Col repeat 1	atg5 vs Col repeat 2	Rank RP UP	FDR Up	Rank RP Down	FDR Down
AT3G57510	ADPG1; ADPG1 [KO:K01184] [EC:3.2.1.15]	69,0299	1088,1557	3	2,88297E-06	22800	0,004377504
AT2G45220	pectinesterase family protein; K01051 pectinest	114,3151	531,7681	9	3,43821E-06	22802	0,004380198
AT1G61820	BGLU46; BGLU46 (BETA GLUCOSIDASE 46) [KO:	76,4324	47,6675	38	1,43643E-05	22785	0,004367903
AT3G13790	ATBFRUCT1; beta-fructofuranosidase/ hydrolas	13,5290	6,7695	341	0,000149729	22516	0,004234623
AT3G59850	polygalacturonase; K01184 polygalacturonase [12,2577	2,9242	591	0,000239682	22201	0,004088274
AT4G25000	AMY1; AMY1 (ALPHA-AMYLASE-LIKE) [KO:K011	3,3959	10,1972	611	0,000245653	22138	0,004061474
AT1G16980	ATTPS2; ATTPS2 [KO:K00697] [EC:2.4.1.15]	10,3061	3,3237	615	0,000246064	22231	0,004108633
AT5G14650	polygalacturonase; K01184 polygalacturonase [2,7737	8,9135	775	0,000306012	21911	0,003987469
AT3G47050	glycosyl hydrolase family 3 protein; K01188 bet	25,6768	0,9543	976	0,000366298	18535	0,002887313
AT4G02280	SUS3; SUS3 (sucrose synthase 3) [KO:K00695] [E	2,7986	3,7261	1323	0,000461288	21645	0,003893492
AT1G17000	ATTPS3; ATTPS3 [KO:K00697] [EC:2.4.1.15]	5,8924	1,7760	1349	0,000467148	21482	0,003835999
AT4G24040	TRE1; TRE1 (TREHALASE 1) [KO:K01194] [EC:3.2	3,9253	2,0366	1565	0,000524823	21462	0,003831117
AT5G37180	SUS5; SUS5 [KO:K00695] [EC:2.4.1.13]	5,8589	1,3943	1685	0,000556091	20959	0,003635307
AT5G20830	SUS1; SUS1 (SUCROSE SYNTHASE 1) [KO:K00695]	2,2770	2,4813	1940	0,000617633	21165	0,003725781
AT2G31390	pfkB-type carbohydrate kinase family protein (E	1,9466	1,9677	2525	0,000763914	20713	0,003563174
AT5G51830	pfkB-type carbohydrate kinase family protein (E	1,7023	2,1226	2687	0,000794523	20531	0,003486278
AT4G27550	ATTPS4; ATTPS4 [KO:K00697] [EC:2.4.1.15]	6,7904	0,6178	3468	0,000948597	10246	0,001576097
AT3G45940	alpha-xylosidase; K01187 alpha-glucosidase [EC	0,8968	0,2791	18438	0,002792135	2287	0,000744555
AT3G03250	UGP; UGP (UDP-glucose pyrophosphorylase) [K	0,4003	0,7693	19763	0,003067371	3820	0,000914631
AT5G48300	ADG1; ADG1 (ADP GLUCOSE PYROPHOSPHORYL	0,3423	0,7835	19797	0,003078846	3263	0,000855247
AT1G66430	pfkB-type carbohydrate kinase family protein (E	0,5835	0,6555	19991	0,003139969	4414	0,00097584
AT5G49190	SUS2; SUS2 (SUCROSE SYNTHASE 2) [KO:K00695]	0,7323	0,3772	20005	0,003142788	2475	0,000767644
AT2G40840	DPE2; DPE2 (DISPROPORTIONATING ENZYME 2)	0,3040	0,7641	20138	0,003177676	2714	0,000794697
AT5G42740	glucose-6-phosphate isomerase; K01810 glucos	0,5253	0,6640	20295	0,0032121	3954	0,000931497
AT3G23820	GAE6; GAE6 (UDP-D-GLUCURONATE 4-EPIMERA	0,3108	0,7460	20375	0,003225011	2641	0,00078804
AT5G24300	SSI1; SSI1 (SUPPRESSOR OF SALICYLIC ACID INSE	0,5592	0,6291	20395	0,003231801	3837	0,000918665
AT1G18580	GAUT11; GAUT11 (Galacturonosyltransferase 1	0,5381	0,6349	20475	0,003258153	3732	0,000899919
AT5G39320	UDP-glucose 6-dehydrogenase; K00012 UDPglu	0,5383	0,6161	20606	0,003293049	3518	0,000880339
AT2G45310	GAE4; GAE4 (UDP-D-GLUCURONATE 4-EPIMERA	0,5383	0,6040	20696	0,003318397	3353	0,000867775
AT5G51820	PGM; PGM (PHOSPHOGLUCOMUTASE) [KO:K01	0,4616	0,6422	20807	0,00335541	3124	0,000845319
AT3G18080	BGLU44; BGLU44 (B-S GLUCOSIDASE 44) [KO:K0	0,2466	0,7196	20809	0,003355744	1926	0,000702136
AT4G33220	PME44; enzyme inhibitor/ pectinesterase (EC:3	0,3381	0,6965	20813	0,003357557	2515	0,000775947
AT1G53830	ATPME2; ATPME2 [KO:K01051] [EC:3.1.1.11]	0,2660	0,7069	20896	0,003380088	2035	0,000708954
AT1G27680	APL2; APL2 (ADPGLC-PPASE LARGE SUBUNIT) [K	0,4506	0,6205	21034	0,003415343	2840	0,000805225
AT3G58790	GAUT15; GAUT15 (Galacturonosyltransferase 1	0,5023	0,5653	21108	0,003440362	2709	0,000795772
AT3G61130	GAUT1; GAUT1 (GALACTURONOSYLTRANSFERA	0,5637	0,4780	21132	0,003446716	2328	0,000755492
AT1G06020	pfkB-type carbohydrate kinase family protein (E	0,5956	0,3812	21156	0,003456329	1861	0,000695959
AT2G36390	SBE2.1; SBE2.1 (starch branching enzyme 2.1) [0,3561	0,6514	21181	0,003461644	2307	0,00075029
AT1G04920	ATSPS3F (sucrose phosphate synthase 3F); sucro	0,5782	0,1801	21509	0,003585775	911	0,000465695
AT4G10260	pfkB-type carbohydrate kinase family protein (E	0,2993	0,5816	21743	0,00368091	1534	0,000622936
AT3G29320	glucan phosphorylase; K00688 starch phosphor	0,2443	0,5811	21841	0,003731329	1257	0,000569966
AT2G19860	HXX2; HXX2 (HEXOKINASE 2) [KO:K00844] [EC:2	0,3192	0,5321	21898	0,003753984	1408	0,000591862
AT4G39210	APL3; APL3 [KO:K00975] [EC:2.7.7.27]	0,0657	0,6113	21960	0,003787663	362	0,00033743
AT5G03650	SBE2.2; SBE2.2 (starch branching enzyme 2.2) [0,3178	0,5054	21990	0,00379688	1275	0,000570829
AT3G46970	PHS2; PHS2 (ALPHA-GLUCAN PHOSPHORYLASE	0,1830	0,5660	22015	0,003807351	962	0,000475051
AT5G64860	DPE1; DPE1 (DISPROPORTIONATING ENZYME) [0,1799	0,5567	22048	0,003829003	916	0,000468001
AT2G21590	APL4; APL4 [KO:K00975] [EC:2.7.7.27]	0,1140	0,4954	22334	0,003983959	483	0,000353398
AT1G05610	APS2; APS2 (ADP-glucose pyrophosphorylase sm	0,3791	0,1415	22335	0,00398415	376	0,000335985
AT5G49180	pectinesterase family protein (EC:3.1.1.11); K01	0,2085	0,3700	22429	0,004038818	597	0,00038119

Figure 35'. Analyse transcriptomique des gènes de la voie des sucres et de l'amidon .

Liste des gènes de la voie des sucres et de l'amidon induits (en rose) ou réprimés (en vert) dans les rosettes du mutant *atg5* par rapport au sauvage à 60JAS sur 2mM.

L'analyse est réalisée selon la méthode du produit des rangs de Breitling (Breitling *et al.*, 2004).

Les colonnes représentent les rapports des intensités *atg5/Col* sur deux expériences.

Rank RP down/up est le rang du « produit des rangs » et indique le rang du gène (de 1 à 22810) dans la liste de gènes sous/sur-exprimés. 1 étant le rang du gène le plus sous/sur-exprimés respectivement pour rank RP down et rank RP up, et 22810 étant le rang du gène le moins sous/sur-exprimés respectivement pour rank RP down et rank RP up.

FDR est le « False Discovery Rate » et donne une idée de la pvalue du rang du produits des rangs. Une FDR inférieure à 10^{-3} a été prise en compte dans nos analyses.

■ FDR Up<0,0001 ■ FDR Up<0,001 ■ FDR Down<0,0001 ■ FDR Down<0,001

gènes codant les protéines des voies de biosynthèse. Dans ce cadre, les données du transcriptome concernant les gènes de la voie de biosynthèse des anthocyanes et de la voie de biosynthèse des sucres ont été analysées pour *atg5* après 60 jours de culture sur 2mM. L'analyse a été faite selon la méthode du « produit des rangs » décrite par Breitling et al. (Breitling *et al.*, 2004).

Cette analyse, présentée en figures 35, montre que les gènes codant les protéines de la voie des phénylpropanoïdes et leurs régulateurs sont sous-exprimés chez *atg5*. Ces résultats ont été vérifiés en Q-PCR par Pauline Anne lors de son stage de Master au laboratoire. L'analyse transcriptomique des gènes de la voie des sucres et de l'amidon (Figure 35') montre des différences d'expression. Certains gènes codant des enzymes de dégradation de l'amidon sont surexprimés alors que d'autres, codant des enzymes intervenant dans sa synthèse sont sous-exprimés. Cette observation peut partiellement expliquer le déficit en amidon observé chez les mutants *atg*.

6.2. Mesures d'activités enzymatiques et analyse du transcriptome des gènes du métabolisme azoté

L'ammonium, originaire de la réduction du nitrate mais aussi de la photorespiration et du recyclage des acides aminés, est majoritairement assimilé dans le chloroplaste via le cycle GS/GOGAT. La glutamine synthétase (GS) fixe un ion ammonium sur une molécule de glutamate pour former la glutamine. Cette glutamine réagit ensuite avec le 2-oxoglutarate pour former deux molécules de glutamate. Cette réaction est catalysée par la glutamine 2-oxoglutarate amino transférase (GOGAT). Lors de la remobilisation, le recyclage et la ré-assimilation de l'azote nécessitent d'être catalysés par d'autres enzymes que celles qui sont chloroplastiques. La GS1 et la glutamate déshydrogénase (GDH) ont été proposées comme deux enzymes aux rôles prépondérants dans la ré-assimilation de l'azote provenant de la protéolyse. Dans le paragraphe précédent, les analyses effectuées ont montré de fortes perturbations dans les compositions en composés azotés chez les mutants d'autophagie. Pour tenter de comprendre l'origine de ces perturbations, l'activité des enzymes et la régulation des gènes impliqués dans le métabolisme azoté ont été analysées.

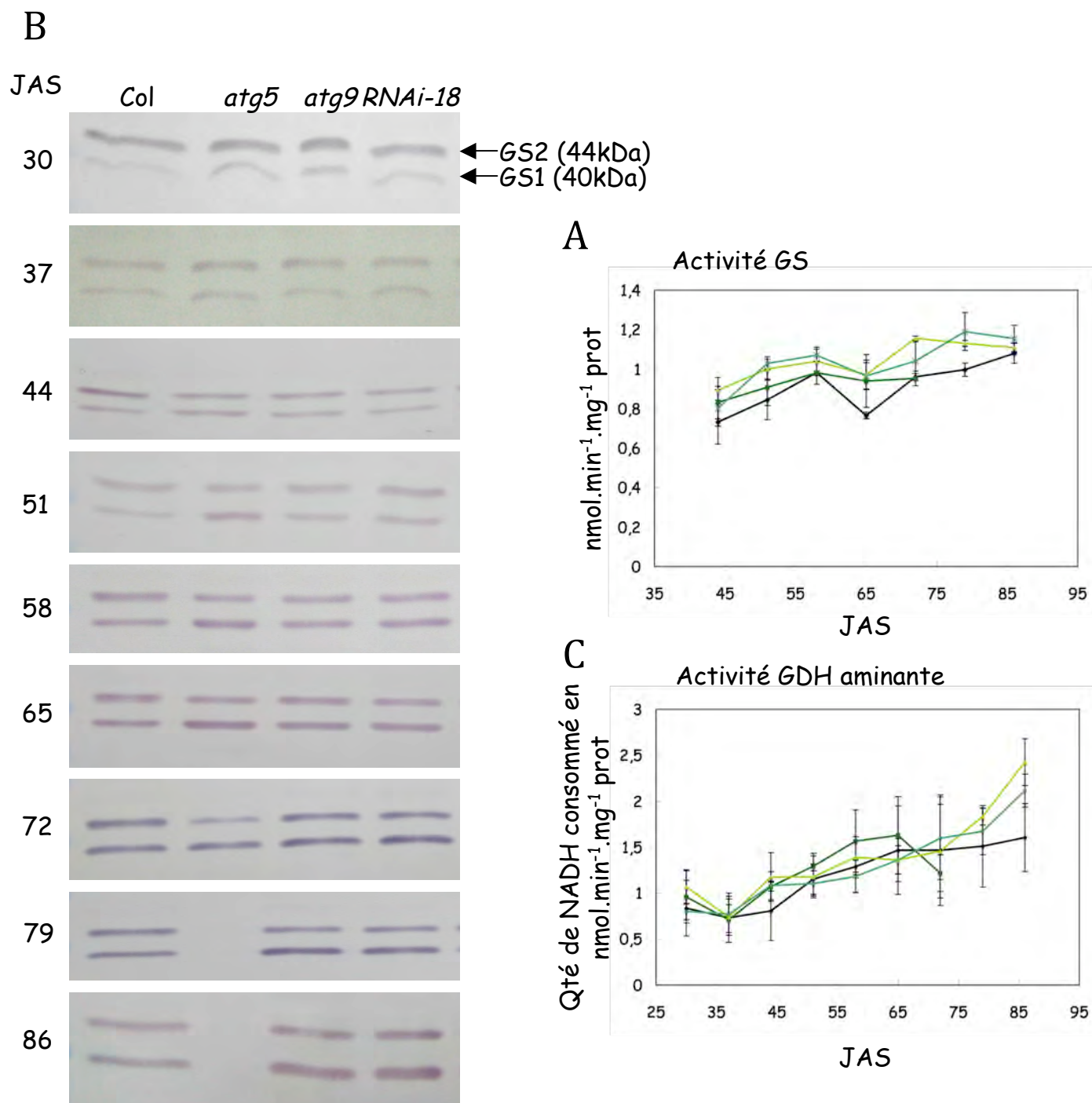


Figure 36. Activités GS et GDH, et contenus en protéines GS1 et GS2 chez les mutants d'autophagie.

(A) Evolution de l'activité GS au cours du développement dans les mutants *atg5*, *atg9* et RNAi-18 et du sauvage sur 2mM.

Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de 3 répétitions biologiques d'un pool de 6 à 12 plantes.

(B) Western-blot représentant l'évolution des quantités de protéines GS1 et GS2 au cours du temps dans les rosettes des mutants *atg5*, *atg9* et RNAi-18 et du sauvage sur 2mM.

(C) Evolution de l'activité GDH au cours du développement dans les mutants *atg5*, *atg9* et RNAi-18 et du sauvage sur 2mM.

Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de 3 répétitions biologiques d'un pool de 6 à 12 plantes.

■ Col ■ *atg5* ■ *atg9* ■ RNAi-18

Mesure de l'activité GS et quantification des protéines GS1/GS2

La synthèse de glutamine, forme de transport majeure de l'azote dans les plantes est catalysée par la glutamine synthétase (GS). Chez les plantes, il existe deux isoformes de cette enzyme : GS1 et GS2. GS1 est cytosolique et GS2 est chloroplastique. L'activité globale (GS1+GS2) a été mesurée au cours du développement sur des cultures faites sur 2mM (Figure 36A). Les résultats montrent que l'activité GS est supérieure dans les mutants *atg* par rapport au sauvage. Par ailleurs, des western-blots réalisés avec un anticorps anti-GS sur les mêmes plantes, dans le but de quantifier les deux isoformes GS1 et GS2, ont révélé une inversion des rapports GS1/GS2 pour les mutants d'autophagie (Figure 36B). Cette inversion commence à 60JAS. A l'inverse du sauvage, GS2 devient moins abondante que GS1 chez les mutants *atg*.

Ainsi, il semblerait que l'augmentation très forte de l'activité GS1 chez les mutants soit responsable de la forte accumulation d'acides aminés chez les mutants d'autophagie, notamment de l'augmentation de la proportion en glutamine et la diminution de la proportion en glutamate.

Mesure de l'activité GDH

In vivo, plusieurs études ont montré que la glutamate déshydrogénase (GDH) est impliquée dans la conversion du glutamate en α -cétoglutarate avec libération d'un ion ammonium (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006). *In vitro*, son activité peut être mesurée dans le sens de l'amination et de la désamination. On considère que la mesure de l'activité aminatrice est plus reproductible et représente mieux la quantité d'enzyme présente dans la cellule. L'activité aminatrice de cette enzyme a été mesurée au cours du temps et sur 2mM. Les résultats ne montrent aucune différence entre le sauvage et les trois mutants d'autophagie (Figure 36C).

Analyse du transcriptome des gènes du métabolisme azoté

L'analyse du transcriptome visant à comparer *atg5* par rapport au sauvage sur 2mM et à 60JAS montre que l'asparagine synthétase 3 (ASN3) et la phénylalanine ammonia-lyase 3 (PAL3) sont sous-exprimés chez *atg5*. A l'inverse, GDH1 et GDH2, ASN1, la nitrate réductase 1 (NIA1) et la glutamate décarboxylase 1 (GAD1) sont surexprimés (Figure 37). Ces résultats semblent montrer une assimilation de l'azote plus efficace chez *atg5* que chez le sauvage et sont cohérents avec l'accumulation de

		atg5 vs Col repeat 1	atg5 vs Col repeat 2	Rank RP UP	FDR Up	Rank RP Down	FDR Down
METABOLISME D'ASSIMILATION PRIMAIRE							
AT5G07440	GDH2; GDH2 (GLU	13,042	3,777	490	0,000204633	22332	0,004148624
AT3G47340	ASN1; ASN1 (GLU	23,707	1,888	499	0,000210246	21861	0,003970886
AT1G77760	NIA1; NIA1 (NITRA	3,596	1,778	1841	0,000587991	21229	0,003746684
AT1G58180	BCA6; carbonic an	2,718	2,006	2000	0,00063061	21159	0,003724014
AT3G03910	GDH3; GDH3 (GLU	2,077	2,288	2170	0,000675855	20992	0,003655029
AT1G08080	ACA7; ACA7 (ALP	6,504	0,103	3972	0,001035806	1206	0,000554075
AT4G37550	formamidase; KO	0,476	0,594	21081	0,003431854	2795	0,000799371
AT5G04230	PAL3; PAL3 (PHEN	0,445	0,591	21240	0,003485851	2505	0,000774749
AT5G10240	ASN3; ASN3 (ASP	0,308	0,644	21359	0,003528813	1898	0,000701246
METABOLISME SECONDAIRE							
Métabolisme de la lysine							
AT2G13810	ALD1; ALD1 (AGD	23,438	28,894	115	4,22569E-05	22716	0,004340058
AT1G54100	ALDH7B4 (Aldehy	2,974	1,633	2202	0,000686789	20968	0,003638392
AT4G33680	AGD2; AGD2 (ABE	0,388	0,806	19281	0,00296413	3992	0,00093534
AT5G52100	crr1; crr1 (chloro	0,526	0,715	19802	0,00307985	4608	0,0009967
AT2G19940	N-acetyl-gamma- γ	0,432	0,646	20919	0,00338526	2915	0,000815906
AT1G31230	AK-HSDH I (ASPA	0,319	0,619	21481	0,00358044	1814	0,000692987
Métabolisme de l'alanine, de l'asparagine et du glutamate							
AT5G17330	GAD; GAD [KO:KO	6,804	44,578	186	7,06794E-05	22541	0,0042475
AT5G07440	GDH2; GDH2 (GLU	13,042	3,777	490	0,000204633	22332	0,004148624
AT3G47340	ASN1; ASN1 (GLU	23,707	1,888	499	0,000210246	21861	0,003970886
AT2G38400	AGT3; AGT3 (ALA	10,051	2,689	715	0,000278328	22113	0,004048847
AT5G11520	ASP3; ASP3 (ASPA	4,788	3,276	1034	0,000377967	21961	0,004001558
AT3G03910	GDH3; GDH3 (GLU	2,077	2,288	2170	0,000675855	20992	0,003655029
AT5G14760	AO; AO (L-ASPAR	2,815	1,378	2698	0,000796789	20497	0,003472251
AT4G24830	arginosuccinate s	0,537	0,649	20376	0,00322629	3877	0,00092319
AT4G39660	AGT2; AGT2 (ALA	0,442	0,671	20675	0,003310622	3246	0,000852399
AT4G38880	ATASE3; ATASE3 (0,496	0,521	21338	0,003520214	2275	0,000743545
AT5G10240	ASN3; ASN3 (ASP	0,308	0,644	21359	0,003528813	1898	0,000701246
AT1G62800	ASP4; ASP4 (ASPA	0,262	0,572	21836	0,003729743	1331	0,000580578
Métabolisme de la phénylalanine, de la tyrosine et de la thréonine							
AT5G11520	ASP3; ASP3 (ASPA	4,788	3,276	1034	0,000377967	21961	0,004001558
AT5G05730	ASA1; ASA1 (ANTI	3,323	2,508	1509	0,000507411	21561	0,003862186
AT1G22410	2-dehydro-3-deox	2,208	1,942	2323	0,000719843	20906	0,003623276
AT5G53970	aminotransferase	2,627	1,522	2528	0,000764393	20686	0,003554854
AT3G54640	TSA1; TSA1 (TRYP	1,531	2,501	2640	0,000779733	20371	0,003433507
AT4G39980	DHS1; DHS1 (3-DE	0,726	0,568	19425	0,002997599	4465	0,00098025
AT1G62800	ASP4; ASP4 (ASPA	0,262	0,572	21836	0,003729743	1331	0,000580578
AT3G55870	anthranilate synt	0,505	0,116	21930	0,003769214	437	0,000347737
Métabolisme de la sérine et de la glycine							
AT2G38400	AGT3; AGT3 (ALA	10,051	2,689	715	0,000278328	22113	0,004048847
AT1G54100	ALDH7B4 (Aldehy	2,974	1,633	2202	0,000686789	20968	0,003638392
AT3G54640	TSA1; TSA1 (TRYP	1,531	2,501	2640	0,000779733	20371	0,003433507
AT5G26780	SHM2; SHM2 (SEF	0,321	0,874	18403	0,002785199	3737	0,000899823
AT1G72810	threonine synthas	0,498	0,643	20631	0,003298793	3472	0,000876609
AT4G39660	AGT2; AGT2 (ALA	0,442	0,671	20675	0,003310622	3246	0,000852399
AT1G31230	AK-HSDH I (ASPA	0,319	0,619	21481	0,00358044	1814	0,000692987

Figure 37. Expression de gènes du métabolisme azoté chez le mutant *atg5*.

Le mutant *atg5* et le sauvage ont été cultivés 60 jours sur 2mM de nitrate. Les ARNs extraits des rosettes ont servis de matrice à des analyses de transcriptome par puces Affymetrix. Les résultats représentent l'induction (en rose) ou la répression (en vert) de gènes du métabolisme azoté chez le mutant *atg5* comparée à leur expression chez le sauvage. L'analyse est réalisée selon la méthode du produit des rangs de Breitling (Breitling *et al.*, 2004).

Les colonnes représentent les rapports des intensités *atg5*/Col sur deux expériences.

RP down/up est le rang du « produit des rangs » et indique le rang du gène (de 1 à 22810) dans la liste de gènes sous/sur-exprimés. 1 étant le rang du gène le plus sous/sur-exprimés respectivement pour rank RP down et rank RP up, et 22810 étant le rang du gène le moins sous/sur-exprimés respectivement pour rank RP down et rank RP up.

FDR est le « False Discovery Rate » et donne une idée de la pvalue du rang du produits des rangs. Une FDR inférieure à 10^{-3} a été prise en compte dans nos analyses.

■ FDR Up<0,0001 ■ FDR Up<0,001 ■ FDR Down<0,0001 ■ FDR Down<0,001

certaines formes d'acides aminés comme le GABA par exemple. La nitrate réductase catalyse la réduction du nitrate en nitrite dans le cytosol. En plus du cycle GS/GOGAT, trois enzymes participent à l'assimilation de l'ammonium. Les asparagines synthétases cytosoliques catalysent le transfert du groupe amine de la glutamine ou de l'ammonium sur une molécule d'aspartate pour former du glutamate et de l'asparagine. Toutefois, l'induction du gène codant la nitrate réductase est assez surprenante car cette enzyme est connue pour être régulée positivement par les sucres, or les mutants d'autophagie contiennent moins de sucres (Pajuelo *et al.*, 1997; Sivasankar *et al.*, 1997). De façon intéressante, la PAL est sous-exprimée chez *atg5*. Il s'agit de l'enzyme qui catalyse la transformation de la phénylalanine en acide cinnamique avec libération d'ammoniaque (NH₃). Cette réaction est la première étape de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Par ailleurs, aucune modification n'est observée au niveau de l'expression des gènes codant les GS1 et GS2, suggérant que les différences observées pour l'activité GS et les contenus en protéines ne sont pas liées à une différence d'expression.

Mesure des activités protéasiques

Les activités des protéases ont été mesurées à deux pH différents pour tenter de discriminer quelles sont les protéases impliquées lors du processus d'autophagie. Les mesures sont effectuées à pH 4,5, qui correspond au pH de la vacuole (Figure 38A), et à pH 7,5 qui s'apparente au pH du cytosol et des chloroplastes (Figure 38B). Les activités des protéases à 30JAS sont similaires entre les mutants d'autophagie et le sauvage à pH 4,5 et à pH 7,5. A 60JAS, les activités mesurées à pH 4,5 sont plus faibles dans les mutants, en particulier *atg5*. En revanche, l'activité protéasique mesurée à pH7,5 est plus importante dans *atg5* et RNAi-18 par rapport au sauvage. A 75JAS, ces différences entre les mutants d'autophagie et le sauvage sont plus importantes qu'au temps précédent. A pH vacuolaire, les activités protéasiques des trois mutants *atg5*, *atg9* et RNAi-18 sont plus faibles que celle du sauvage. Ce bouleversement des activités protéasiques suggère un changement dans la nature des protéases présentes dans les mutants ainsi qu'une modification de leur localisation qui méritent d'être étudiés. L'analyse du transcriptome n'a pas permis de répondre à la question de la localisation. Toutefois, sur les 240 gènes que comprend la liste des protéases et inhibiteurs de protéases dont nous disposons, 39 gènes sont significativement sous-exprimés et 53

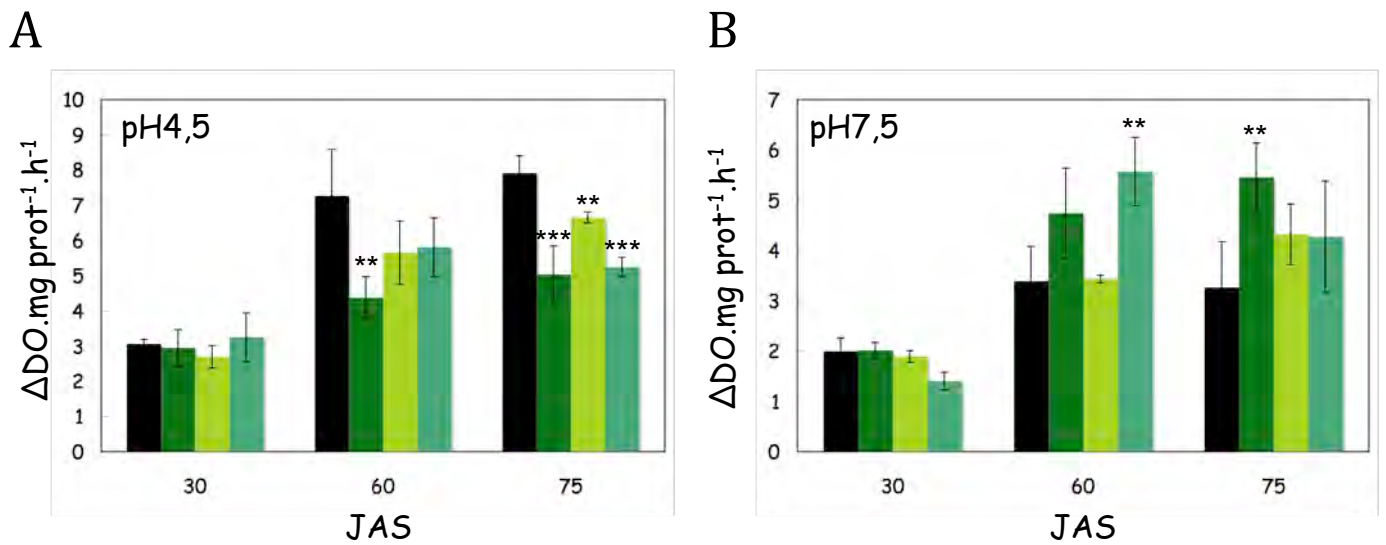


Figure 38. Mesure des activités protéasiques dans les rosettes des mutants d'autophagie.

(A) Mesure de l'activité des protéases à pH4,5 dans les rosettes des mutants *atg5*, *atg9* et RNAi-18 et du sauvage à 30,60 et 75JAS sur 2mM de nitrate.

(B) Mesure de l'activité des protéases à pH7,5 dans les rosettes des mutants *atg5*, *atg9* et RNAi-18 et du sauvage à 30,60 et 75JAS sur 2mM de nitrate.

Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de 3 répétitions biologiques d'un pool de 6 à 12 plantes.

Test de Student : * pour $p < 0,1$; ** pour $p < 0,05$; *** pour $p < 0,01$

■ Col ■ *atg5* ■ *atg9* ■ RNAi-18

significativement surexprimés. Parmi les gènes sous-exprimés, 18 codent des inhibiteurs de protéases et parmi les gènes surexprimés, 17 codent des inhibiteurs de protéases (Annexe 5). Cette analyse n'a pas permis de renseigner la localisation des protéases ou inhibiteurs de protéases différentiellement exprimés, mais témoigne d'un bouleversement dans la régulation des activités protéasiques par l'expression de nouvelles protéases ou la répression d'autres via leurs inhibiteurs. De façon intéressante, cette étude a révélé une forte surexpression du gène homologue de BnD22 (*Brassica napus* Drought 22kD). Cette protéine possède la fonction d'inhibiteur trypsique et est connue pour protéger les tissus jeunes par le maintien du métabolisme face à des conditions stressantes. Les auteurs suggèrent que BnD22 contribue à une meilleure utilisation de l'azote recyclé à partir des tissus sources (Desclos *et al.*, 2008).

6.3. Transports des composés carbonés et azotés

Les sucres solubles et les acides aminés sont véhiculés dans la plante par les vaisseaux du xylème et du phloème. L'accumulation des acides aminés observée dans les rosettes des mutants *atg* pourrait être la conséquence d'un défaut de chargement dans les vaisseaux conducteurs. Afin de détecter éventuellement un défaut dans la mise en place des vaisseaux et/ou dans leur structure, des pétioles de feuilles prélevés sur des plantes âgées de 60 jours ont été colorés au carmin aluné vert d'iode (Figure 39). La cellulose, constituant du phloème est coloré en rose et la lignine, constituant du xylème est coloré en vert. D'après les colorations réalisées, les vaisseaux de xylème et de phloème ne semblent pas différents par rapport au sauvage. La structure du système vasculaire des mutants d'autophagie n'est pas altérée par rapport au sauvage. De plus, l'étude métabolique a révélé une accumulation des composés pariétaux dans les mutants *atg* comme le ribose, le galacturonate, le ribonate ou encore l'arabinose (Figure 33) et l'étude transcriptomique montre que les gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des composés pariétaux sont largement surexprimés chez ces mutants (Figure 40). En effet, le profil présenté en figure 40, réalisé grâce au logiciel Virtual Plant à partir de la liste des cent gènes les plus surexprimés dans *atg5* sur 2mM et à 60JAS montre que les gènes intervenant dans la mise en place des parois sont largement affectés.

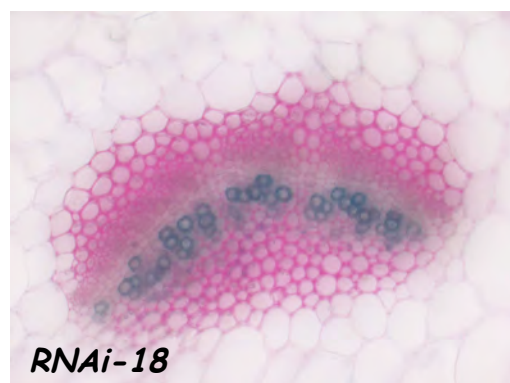
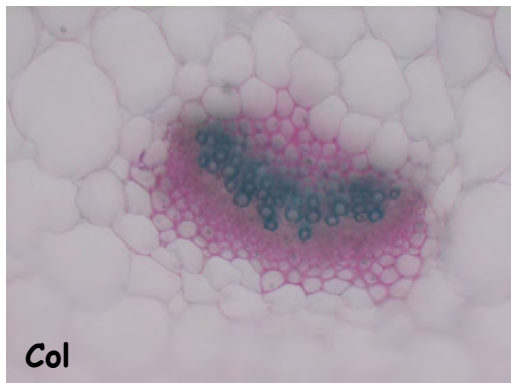
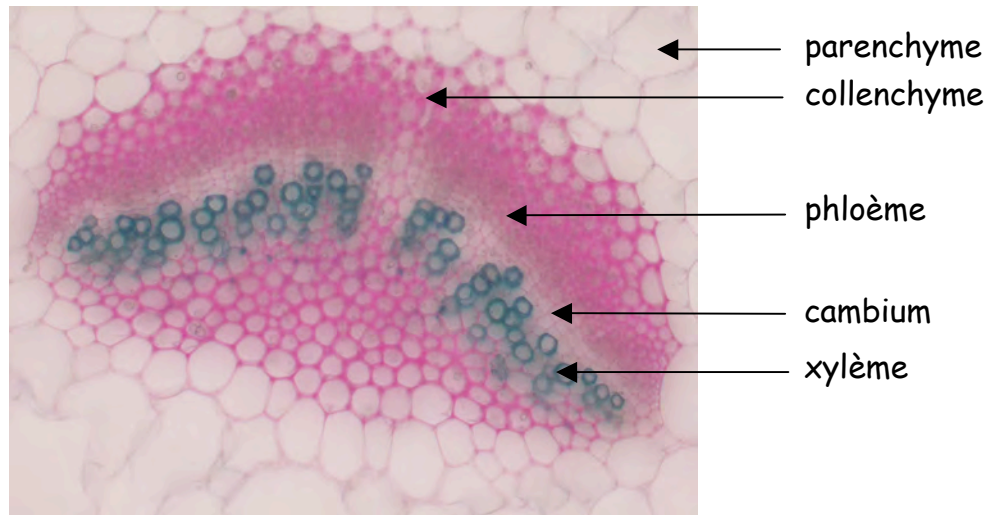


Figure 39. Observations de la vascularisation dans des pétioles chez les mutants d'autophagie.

Des pétioles des mutants *atg5*, *atg9* et RNAi-18, et du sauvage sur 10mM à 60JAS ont été coupés, et les coupes colorées au carmin aluné vert d'iode. Ce colorant marque la lignine en vert et la cellulose en rose. Les coupes sont observées en microscopie photonique.

7. Quelles cibles pour l'autophagie ?

Nous avons pu montrer dans le paragraphe précédent que les concentrations en protéines étaient plus élevées dans les mutants d'autophagie par rapport au sauvage et qu'ils existaient des modifications des activités protéasiques. Nous avons également observé qu'à partir de 60JAS, des modifications des contenus respectifs en GS1 et GS2 et des activités GS ne sont pas accompagnées de différence au niveau des transcrits. Nous avons alors cherché à savoir quelles sont les protéines qui s'accumulent préférentiellement dans ces mutants. À cette fin, plusieurs Western-blot ont été réalisés avec des anticorps dirigés contre des protéines de différents compartiments comme le cytosol, le chloroplaste, la mitochondrie ou encore le ribosome.

Accumulation de produits de dégradation des protéines chloroplastiques

Plusieurs western-blot ont été réalisés avec des anticorps dirigés contre la glutamine synthétase et la grande sous-unité de la rubisco sur des extraits protéiques foliaires de plantes prélevées toutes les semaines de 30JAS jusqu'à 75JAS. La rubisco est toujours présente en grande quantité, que ce soit dans les mutants d'autophagie ou dans le sauvage. Aucune différence dans la concentration de cette protéine n'est détectable entre les différents génotypes par cette méthode. Néanmoins, de façon très intéressante, l'apparition de bandes surnuméraires de taille inférieure à celle de la grande sous-unité de la rubisco a été observée à partir de 60JAS (Figure 41A). Les tailles de ces bandes sont 46, 44, 42, 39, 35 et 31 kDa et ces fragments semblent correspondre aux produits générés lors des premières étapes de dégradation de la rubisco par l'effet du stress oxydatif décrites dans la littérature. En effet, Nakano et al. (Nakano *et al.*, 2006) a observé chez le concombre l'apparition de produits de dégradation de la rubisco aux tailles 45, 43, 42, 37 et 33kDa. De la même façon, l'apparition de bandes surnuméraires réagissant avec l'anticorps dirigé contre les deux GS a été observée. La présence de ces produits suggère une accumulation des produits de dégradation de la rubisco et de la GS chez les mutants d'autophagie. L'inversion GS1/GS2 laisse penser que, dans le cas de la GS, ce sont des produits de dégradation de la GS2, forme chloroplastique de l'enzyme. L'accumulation de produits correspondrait à la dégradation partielle de ces deux protéines due à un déficit d'activité autophagique, comme si le processus de turn-over des protéines était incomplet.

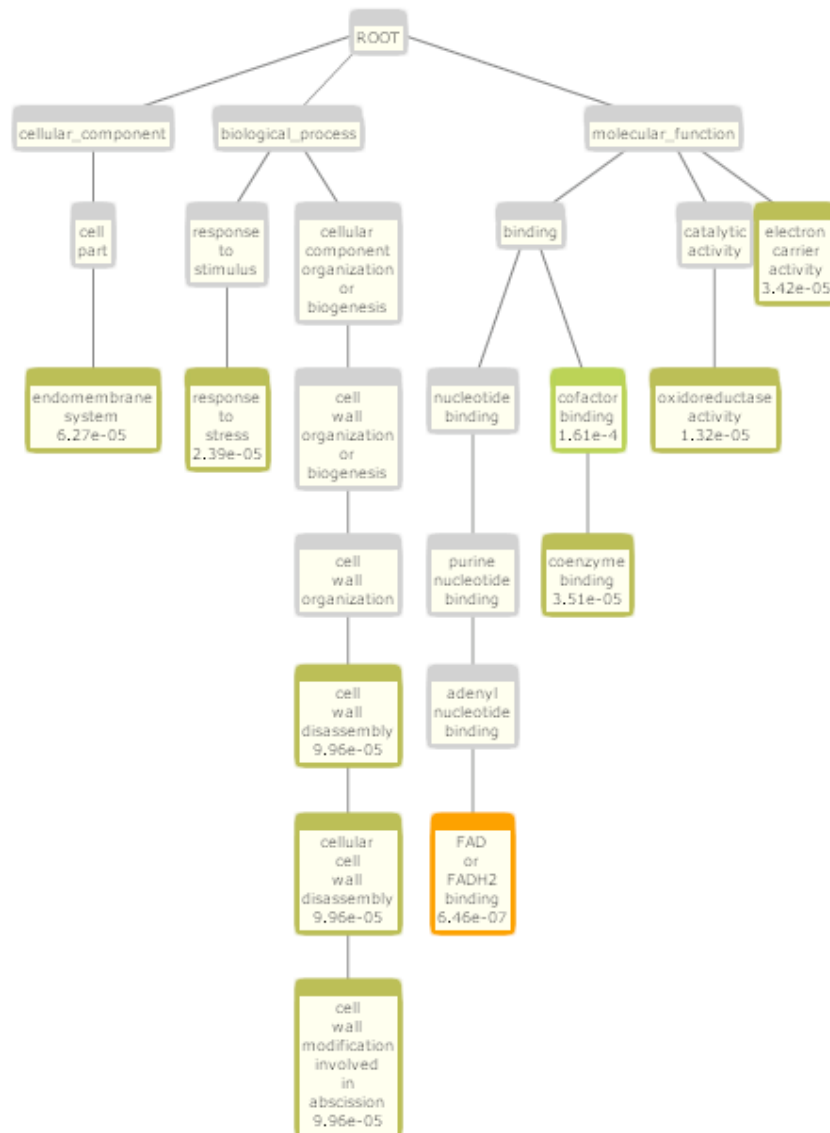


Figure 40. Représentation Virtual Plant des cent gènes les plus surexprimés chez *atg5* .

L'arbre a été réalisé grâce au logiciel Virtual Plant avec la liste des cent gènes les plus surexprimés chez *atg5* par rapport au sauvage sur 2mM et à 60JAS.



Les couleurs représentent une échelle de significativité.

Protéines ribosomales

Les ribosomes sont des compartiments de la cellule riches en azote. Par exemple, un ribosome fonctionnel, composé de sa grande et de sa petite sous unités a un poids moléculaire de 4 200kDa. Plusieurs Western-blot ont été réalisés avec des anticorps dirigés contre des protéines ribosomales L13, S14 et S6 (Figure 41B). L13 est une protéine qui fait partie de la grande sous-unité des ribosomes et semble être située dans la mitochondrie ou les plastes d'après les prédictions du site internet SUBAII (<http://suba.plantenergy.uwa.edu.au/>). S14 et S6 font partie de la petite sous-unité des ribosomes. S14 semble être mitochondriale d'après les prédictions données par le site SUBAII. S6 serait plastidiale ou cytosolique. Les analyses ont été réalisées sur des extraits protéiques de rosettes du mutant *atg5* et du sauvage cultivés sur 2 et 10mM de nitrate et prélevées à 60JAS. Que ce soit pour des plantes cultivées sur 2mM ou 10mM de nitrate, la protéine L13 s'accumule dans le mutant *atg5* par rapport au sauvage. De la même manière, S6 s'accumule dans *atg5*. Par contre, le western blot réalisé avec l'anticorps anti-S4 ne montre pas de différence entre le mutant et le sauvage. Ces résultats suggèrent que le turn-over des ribosomes est affecté dans les mutants d'autophagie. Néanmoins, seules certaines espèces de ribosomes sont la cible de l'autophagie.

Protéines mitochondriales

Les mitochondries sont, avec les chloroplastes, le lieu de synthèse des ROS. Il a été montré, chez les animaux, qu'elles sont des cibles de l'autophagie lorsqu'elles produisent des ROS de façon trop abondante et nocive pour la cellule. Des western-blot ont été réalisés avec des anticorps anti-GDH et anti-IDH (isocitrate déshydrogénase) (Figure 41B). Une accumulation de GDH est détectée dans *atg5* par rapport au sauvage à 30 et à 60JAS sur 2mM. Sur 10mM, aucune modification du contenu en GDH n'est détectée. Le western-blot réalisé avec l'anticorps anti-IDH révèle une différence entre le sauvage et le mutant à 30JAS sur 2mM de nitrate. A 60JAS et sur 2mM de nitrate, l'apparition de bandes surnuméraires reconnues par l'anticorps et de taille inférieure à celle de la protéine est observée pour *atg5*.

Ces résultats suggèrent que GDH et IDH sont des cibles potentielles de l'autophagie tout comme les mitochondries dans leur ensemble chez *Arabidopsis thaliana*.

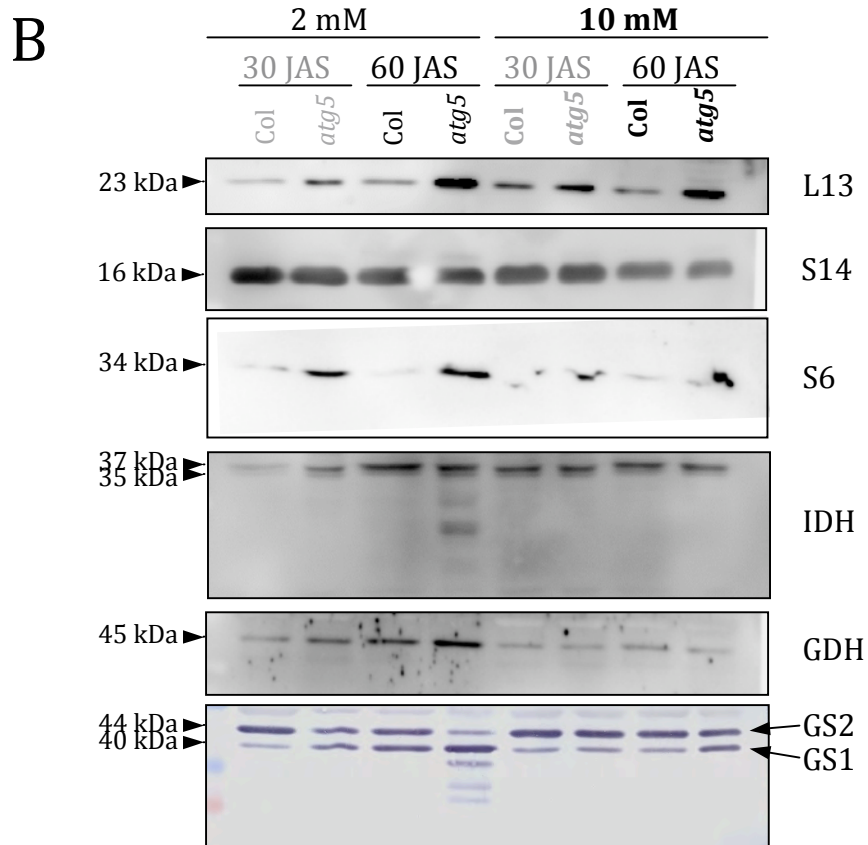
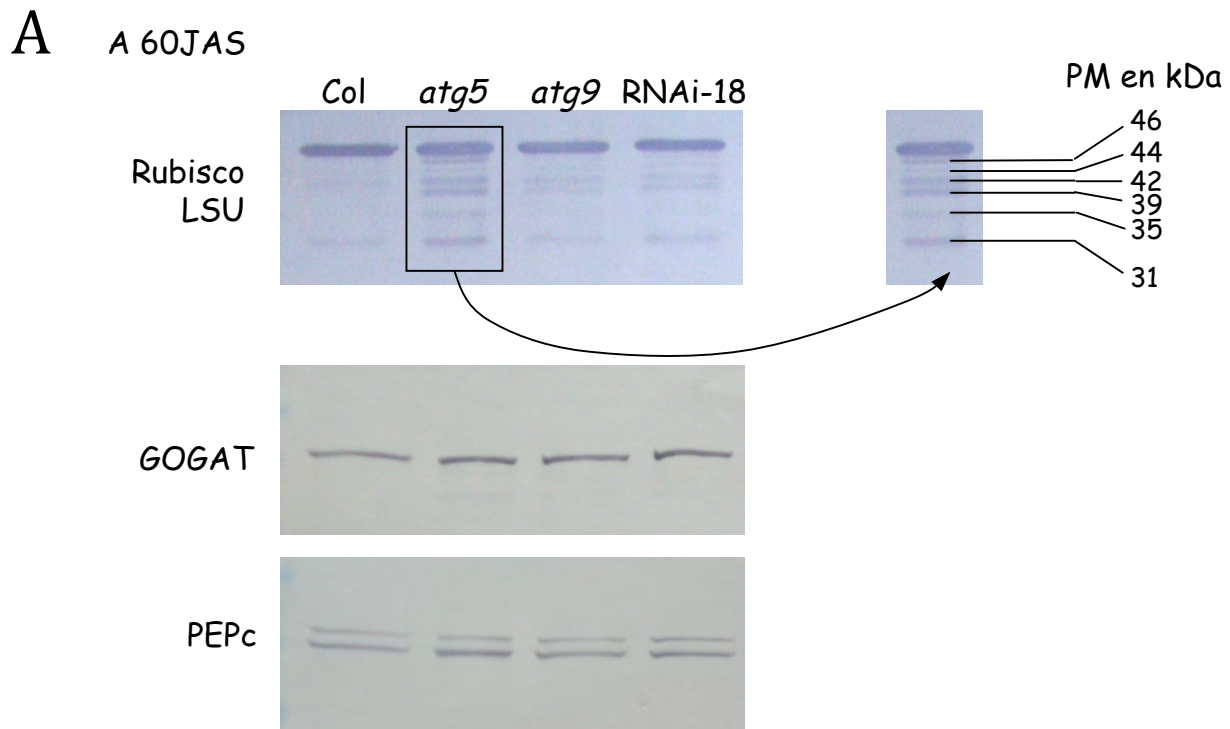


Figure 41. Evolution des quantités de différentes protéines de différents compartiments cellulaires.

(A) Western-blots réalisés avec des anticorps anti-rubisco, anti-GOGAT et anti-PEPc sur des rosettes des mutants *atg5*, *atg9* et RNAi-18 et du sauvage sur 2mM et à 60JAS.

(B) Western-blots réalisés avec des anticorps anti-L13, anti-S14, anti-S6, anti-IDH, anti-GDH et anti-GS sur des rosettes du mutant *atg5* et du sauvage sur 2 et 10mM, à 30 et 60JAS.

Sélectivité de l'autophagie

Si certaines protéines semblent être des cibles privilégiées de l'autophagie, leur origine cellulaire ne semble pas être la cause de leur mode de dégradation. Ainsi, aucune différence n'a été observée quant au contenu en PepC (cytosolique) et en GOGAT (chloroplastique) témoignant que l'autophagie est un processus de dégradation sans doute ciblé envers certaines protéines plutôt que vers certains compartiments cellulaires dans leur globalité (Figure 41A).

C. Discussion

1. Diagnostique physiologique et métabolique des mutants d'autophagie

Le schéma présenté en figure 42 a pour objectif de synthétiser le métabolisme d'une cellule d'un mutant d'autophagie en résumant les observations et les résultats obtenus lors de cette étude.

Le chloroplaste est l'organite qui possède la source majeure d'azote pour la remobilisation. La rubisco représente à elle seule 50% des protéines solubles foliaires (Mae *et al.*, 1983). Il est le premier compartiment à être démantelé lors du processus de remobilisation de l'azote. Les chloroplastes se sont révélés une cible potentielle de l'autophagie (Ishida & Yoshimoto, 2008). Les western-blots réalisés avec des anticorps dirigés contre des protéines chloroplastiques comme la GS et la rubisco semblent confirmer cette hypothèse en montrant la présence de fragments correspondant à des produits de dégradation de ces deux protéines. Cette observation montre que le processus initial de dégradation partielle des protéines a sans doute été initié à l'intérieur du chloroplaste mais que la dégradation ultérieure des peptides générés n'est pas aboutie. En effet, les premières étapes de dégradation de ces deux protéines sont connues pour se produire dans ce compartiment sous l'action des ROS (Ishida *et al.*, 1998; Palatnik *et al.*, 1999; Nakano *et al.*, 2006). Pour que la protéolyse soit aboutie, ceci implique que ces fragments soient transportés jusqu'à la vacuole car c'est elle qui renferme la grande part des protéases induites lors de la sénescence. L'augmentation importante de la concentration en protéines et en peptides chez les mutants d'autophagie révèle un défaut d'export vers la vacuole qui est en corrélation avec la diminution des activités protéasiques mesurées à pH vacuolaire. L'augmentation des activités mesurées à pH7,5 pourrait être une réponse visant à compenser ce déficit en ciblant d'autres protéases vers d'autres compartiments. Une mauvaise gestion du turnover des protéines chloroplastiques pourrait provoquer un dysfonctionnement des fonctions d'assimilation et de gestion des ressources carbonées et expliquer que les mutants d'autophagie contiennent moins de sucres solubles et insolubles ainsi que

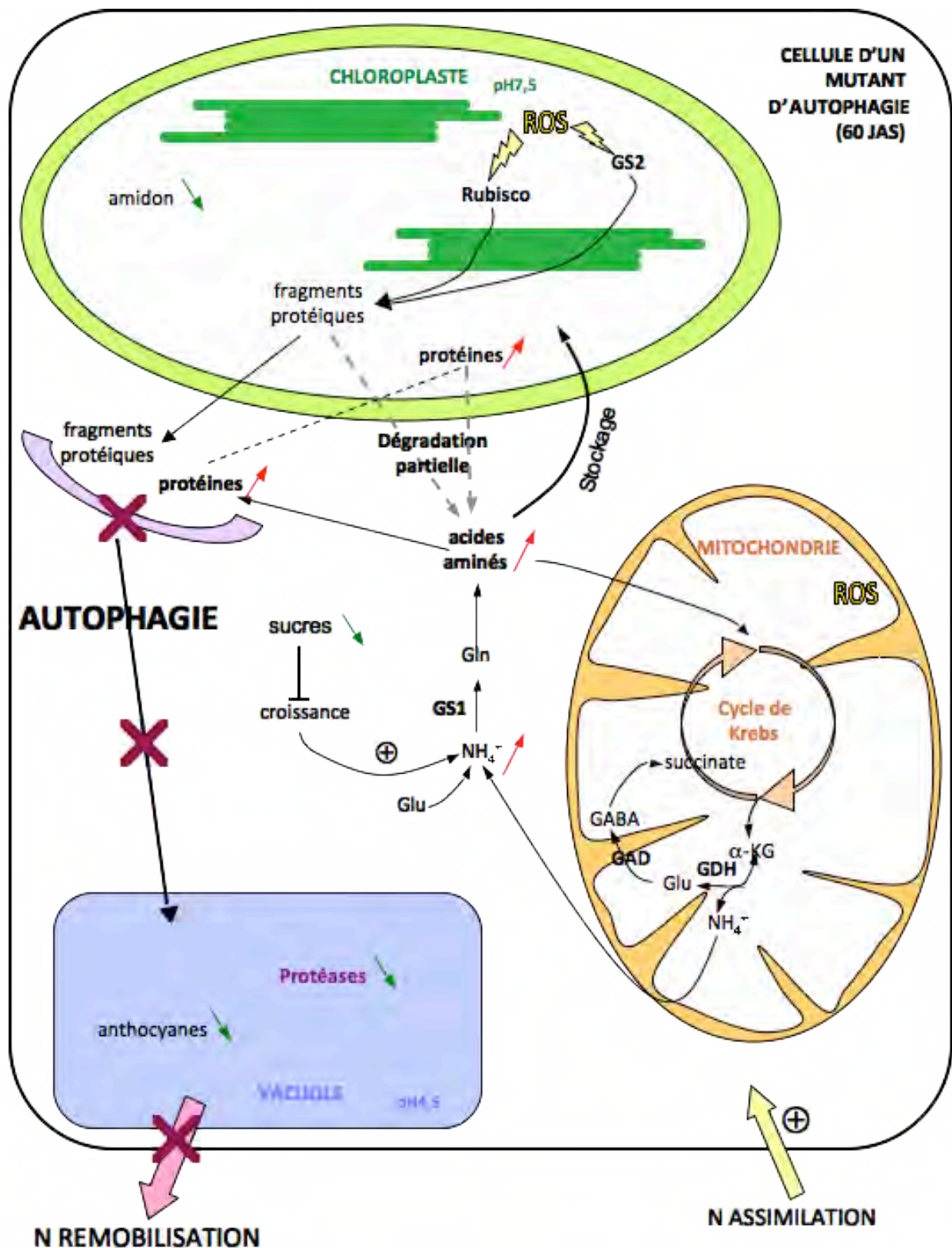


Figure 42. Modèle de synthèse remplaçant les perturbations physiologiques et métaboliques observées dans la cellule d'un mutant d'autophagie en condition limitante en azote et à 60JAS. (GS : Glutamine synthétase ; GDH : Glutamate déshydrogénase ; ROS : Espèces réactives de l'oxygène ; α-KG : alpha-cétoglutarate ; GAD : Glutamate Décarboxylase)

d'anthocyanes. La diminution des ressources en sucres aurait alors un effet négatif sur la croissance des mutants.

Les feuilles des mutants d'autophagie, de taille inférieure à celles du sauvage, concentrent alors l'ammonium et les acides aminés provenant sans doute d'une dégradation partielle des protéines et d'une néosynthèse continuellement maintenue pour pallier le déficit de recyclage. Le fait que l'activité de la GS soit maintenue, voire augmentée chez les mutants d'autophagie expliquerait notamment l'augmentation des proportions en glutamine, laquelle peut également être à l'origine de la synthèse des autres acides aminés. Avec l'augmentation du pourcentage en azote, ces résultats suggèrent que contrairement à l'assimilation du carbone, le métabolisme d'assimilation de l'azote est efficace chez les mutants d'autophagie. Le catabolisme des acides aminés représentés par le GABA et le glutamate pourrait d'ailleurs représenter une source d'énergie alternative à celle des sucres pour les cellules du mutant, comme suggéré par la forte expression d'une des isoformes de la GAD et de la GDH.

Ces perturbations conduisent, au global, à la modification du rapport C/N avec un contenu en azote supérieur chez les mutants d'autophagie par rapport au sauvage.

Phénotypes intermédiaires d'*atg9* et du RNAi-18

Les analyses réalisées lors de cette étude révèlent un phénotype intermédiaire pour les deux mutants *atg9* et RNAi-18, situé entre celui du sauvage et *atg5*. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que le processus d'autophagie n'est pas complètement inhibé dans ces deux génotypes. La plante transgénique RNAi-18 possède un ARN interférant qui ne réduit l'expression que d'*ATG18a* (Xiong *et al.*, 2005). Or AtATG18 est codée par une famille multigénique composée de huit gènes et l'expression des autres gènes n'est pas diminuée dans cette plante transgénique. Néanmoins, elle présente les phénotypes « classiques » d'un mutant d'autophagie à savoir qu'elle est sensible à la carence nutritionnelle, que la sénescence foliaire y est accélérée et que la formation des autophagosomes y est inhibée (Xiong *et al.*, 2005). Ce dernier point a été mis en évidence par l'utilisation de Monodansylcadaverine, montrée plus tard comme non spécifique des autophagosomes puisque ce composé marque les compartiments acides de la cellule. Lors d'observations personnelles, la présence de quelques corps autophagiques dans les cellules racinaires de cette plante a été mise en évidence par l'utilisation de Concanamycine A. Ces observations montrent que l'inhibition du

processus d'autophagie n'est pas totale et expliquent le phénotype intermédiaire du RNAi-18. Par ailleurs, bien que le mutant *atg9* soit knock-out, il accumule des corps autophagiques en présence de E-64d, nommés « inclusions vacuolaires » par les auteurs (Inoue *et al.*, 2006). D'après ces observations, les auteurs ont suggéré que la protéine AtATG9 contribue au processus d'autophagie mais n'est pas essentielle contrairement à AtATG5. Ces observations faites pour les mutants *atg9* et RNAi-18 expliquent leurs phénotypes intermédiaires obtenus lors de cette analyse physiologique.

2. Les signatures métaboliques répondent-elles à une adaptation à la limitation en azote ?

Un grand nombre d'autophagosomes sont observés dans les cellules racinaires d'*Arabidopsis* soumis à une carence en azote (Yoshimoto *et al.*, 2004) et les gènes *ATG* sont induits en situation de limitation en azote. D'ailleurs, les mutants d'autophagie sont décrits comme des plantes sensibles à la limitation en azote car leur phénotype de sénescence est exacerbé et la taille de leurs rosettes est plus petite dans ces conditions. Comme l'autophagie permet le recyclage de l'azote, nous nous attendions à ce que les mutants gèrent moins bien leur azote et présentent éventuellement les signatures métaboliques de plantes carencées en azote. Les plantes, soumises à une limitation ou une carence en azote, développent des réponses adaptatives. Ces réponses incluent une accumulation de composés carbonés comme les sucres solubles et insolubles et une baisse de la concentration en azote qui se manifeste principalement par une diminution de la concentration en acides aminés libres (Diaz *et al.*, 2006; Lemaitre *et al.*, 2008) et un développement racinaire plus important. Or, les résultats obtenus sur les mutants d'autophagie montrent au contraire une diminution des concentrations en sucres et une augmentation des concentrations en acides aminés et des teneurs en protéines. De plus, la limitation en azote est connue pour induire l'accumulation d'anthocyanes ainsi que l'expression des gènes de la voie de biosynthèse des anthocyanes (Lillo *et al.*, 2008). Comme le mutant *nla* (*nitrogen limitation adaptation*) (Peng *et al.*, 2008), les mutants d'autophagie accumulent moins d'anthocyanes que le sauvage et les gènes de la voie de biosynthèse des anthocyanes sont sous-exprimés en situation de limitation en azote.

En résumé, les signatures métaboliques vont dans la plupart des cas à l'inverse des changements généralement observés pour une réponse à la limitation en azote

(Lemaitre *et al.*, 2008). Toutes ces observations montrent que les mutants d'autophagie ne présentent pas les caractéristiques phénotypiques et métaboliques des plantes adaptées à la limitation. Ces mutants d'autophagie gèrent mal les situations de limitation en azote.

3. Autophagie : turnover des protéines et sélectivité

Les expériences de marquage réalisées grâce à l'isotope stable ^{15}N ont permis de montrer un défaut de remobilisation chez les mutants d'autophagie suggérant un rôle essentiel de ce processus dans le turn-over des protéines. Le turn-over des protéines constitue l'étape initiale du processus de remobilisation. Les western-blots réalisés avec des anticorps anti-protéines chloroplastiques ont révélé la présence de bandes surnuméraires de tailles inférieures à celle de la protéine. Ces résultats montrent que la dégradation a commencé dans le chloroplaste, générant des fragments mais le processus complet de dégradation est interrompu à cause du déficit d'autophagie.

Par ailleurs, les protéines ribosomales et mitochondriales ne sont pas toutes la cible de l'autophagie. En effet, certaines s'accumulent comme L13 et S6 et d'autres pas (S14). Ce résultat suggère que la nature des cibles de l'autophagie est indépendante de leur localisation. Cette hypothèse implique que la machinerie de l'autophagie interagisse spécifiquement avec ces protéines. Chez les animaux et la levure, ATG8 est un élément essentiel dans l'exercice de la sélectivité. En effet, ATG8 est capable d'interagir avec un motif « WXXL » (X est n'importe quel acide aminé) de la protéine substrat. Dans l'introduction, différents types d'autophagie sélective décrits chez les animaux ont été présentés. L'interaction entre les récepteurs autophagiques et les protéines ATG8 via les motifs d'interaction contribue à la sélection spécifique de certaines protéines. Il a été proposé que la famille protéique ATG8 soit également capable de se lier à des protéines réceptrices spécifiques. Les profils d'expression des gènes *AtATG8s* varient considérablement suivant différents stress alors que ceux des autres gènes du cœur de la machinerie autophagique restent statiques (Hayward *et al.*, 2009). Ces profils d'expression non uniforme suggèrent que les différentes protéines *AtATG8s* ont des rôles spécifiques. Bien que l'identification des protéines contenant des motifs d'interaction avec ATG8 ait été intensive chez les animaux et la levure, seulement deux publications très récentes relatent l'existence de protéines cibles chez les plantes. La

première a identifié AtNBR1 comme un substrat sélectif de l'autophagie (Svenning *et al.*, 2011). La protéine NBR1 est déjà connue chez les mammifères comme protéine adaptatrice de l'autophagie. La seconde publication montre que la protéine TSPO (Tryptophan-rich Sensory Protein) possède un motif d'interaction à ATG8 et est dégradée de façon sélective par l'autophagie (Vanhee *et al.*, 2011). De façon intéressante, TSPO se lie aux hèmes qui peuvent être des composés toxiques générant des ROS. Dans des conditions où ils peuvent être néfastes pour la cellule, TSPO se lie aux hèmes et les achemine vers une dégradation sélective en interagissant avec ATG8. Dans ce contexte de sauvegarde de l'intégrité cellulaire, la place des ROS s'avère importante dans la sélectivité de l'autophagie. En effet, les chloroplastes et les mitochondries, lieu de synthèse des ROS semblent être des cibles privilégiées de l'autophagie. L'action de l'autophagie dans la gestion des signaux de stress a déjà été évoquée lors d'une infection par un pathogène afin de limiter la dispersion de la mort cellulaire associée à la HR.

4. Le phénotype métabolique des mutants d'autophagie est-il lié à leur phénotype de sénescence ?

Les mutants d'autophagie sont décrits comme présentant une sénescence précoce de leur rosette, caractérisée par un jaunissement de leurs feuilles plus important par rapport au sauvage. Caractérisée visuellement par ce changement de couleur, les feuilles passant du vert au jaune, la sénescence est une étape du développement qui correspond à un profond remaniement du métabolisme. La sénescence, bien que conduisant à la mort de l'organe, a en fait pour objectif de maintenir la viabilité de l'espèce ou de l'individu en recyclant les nutriments indispensables. Elle reflète le passage d'un métabolisme d'assimilation et d'expansion foliaire à un métabolisme de catabolisme, de dégradation progressive des constituants cellulaires et de remobilisation des ressources nutritives. La progression du démantèlement des constituants de la cellule au cours de la sénescence est très ordonnée. A la fin du processus de sénescence, la forte accumulation de ROS annonce la mort cellulaire. Toutefois, la mort cellulaire à laquelle la sénescence conduit n'est que le résultat de l'affaiblissement des structures cellulaires après la remobilisation des nutriments vers les organes en développement (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003). Bien que les mutants d'autophagie présentent un jaunissement précoce des feuilles, nos

A

2mM



B

10mM

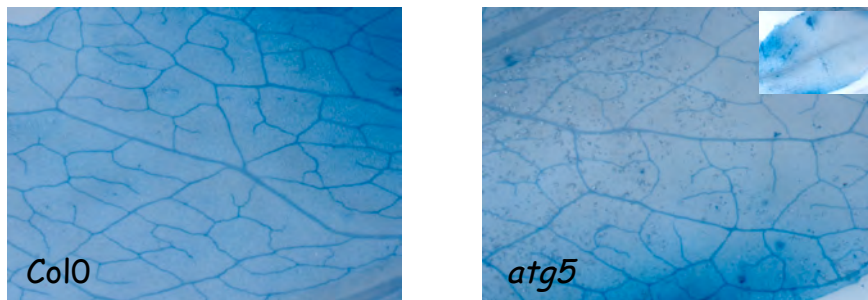


Figure 43. Visualisation des cellules mortes dans les feuilles des mutants d'autophagie.

(A) Des feuilles des mutants *atg5* et *atg9*, et du sauvage sur 2mM et à 60JAS ont été colorées au bleu trypan.

(B) Des feuilles du mutant *atg5* et du sauvage sur 10mM et à 60JAS ont été colorées au bleu trypan.

résultats montrent que les perturbations métaboliques observées ne sont pas des signatures métaboliques de la sénescence développementale ou induite telle qu'elle est décrite dans la littérature, comme la diminution de la concentration en protéines, la diminution du pourcentage en azote et l'augmentation des contenus en sucres (Pourtau *et al.*, 2004).

Le jaunissement des feuilles chez les mutants *atg* initialement décrit comme sénescence précoce pourrait être lié à une mort cellulaire accrue et une mauvaise gestion des signaux de mort par les mutants d'autophagie.

5. Autophagie, mort cellulaire et gestion du stress

L'étude métabolique menée sur les mutants d'autophagie a révélé une diminution de la quantité d' α -tocophérol et de dehydroascorbate chez *atg5* par rapport au sauvage. Chez les plantes, les tocophérols sont synthétisés dans les plastes où ils protègent les membranes de la dégradation oxydative par les ROS (Lichtenthaler *et al.*, 1981). Ils représentent des antioxydants capables de « neutraliser » les ROS dans le chloroplaste et contribuent à préserver un statut rédox optimal au sein du chloroplaste (Munne-Bosch, 2005). Le dehydroascorbate est également un antioxydant permettant de limiter la peroxydation des lipides. Les mutants d'autophagie présentent également un déficit en anthocyanes. Le rôle des anthocyanes est encore mal connu, mais ceux-ci pourraient servir d'écran protecteur des thylacoïdes, limitant la production de ROS. A l'inverse, cette étude a révélé la présence de composés toxiques pour la cellule comme l'acide salicylique, le pipécolate (Moulin *et al.*, 2006) et l'accumulation de certains acides aminés comme la leucine, l'isoleucine et la valine dont l'accumulation semble être problématique pour la survie cellulaire (Ishizaki *et al.*, 2006). L'accumulation de ces composés représente un fort stress pour la cellule et peut conduire à un phénomène de mort cellulaire. Afin de répondre à cette hypothèse, des feuilles des mutants *atg5* et *atg9*, et du sauvage sur 2mM et des feuilles d'*atg5* et du sauvage sur 10mM ont été colorées à 60JAS avec du bleu Trypan (Figure 43). Le bleu Trypan est un colorant qui permet de visualiser les cellules mortes dans un tissu végétal. De façon intéressante, ces photographies montrent que, bien que les feuilles des mutants d'autophagie ne présentent aucun signe de jaunissement, de nombreuses cellules mortes sont visibles.

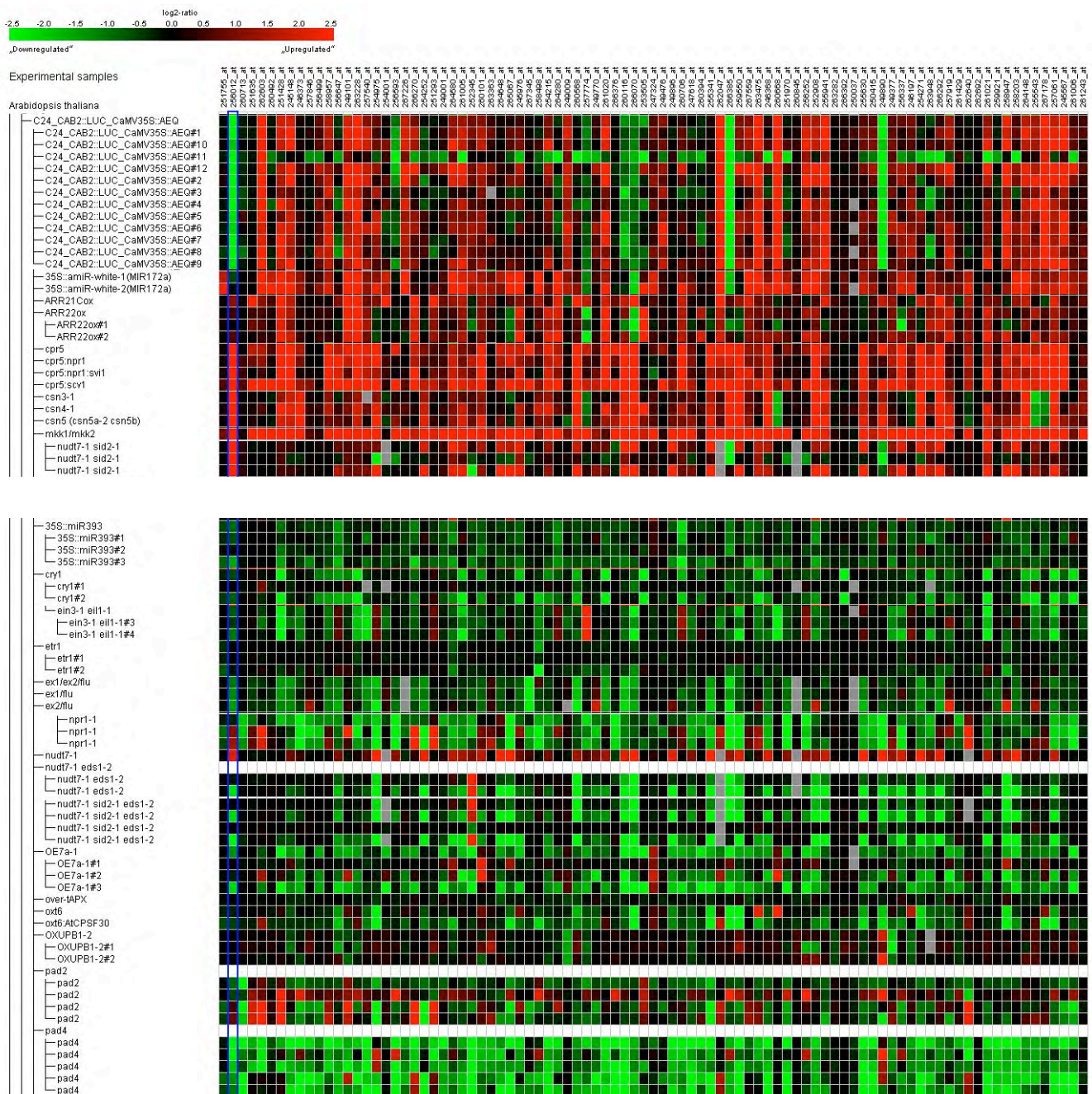


Figure 44. Le transcriptome du mutant *atg5* sur 2mM à 60JAS possède des similitudes avec des mutants présentant des lésions (en l'absence d'attaque d'un pathogène).

Comparaison réalisée grâce au logiciel Genevestigator avec la liste des cent gènes les plus surexprimés chez *atg5* par rapport au sauvage su 2mM et à 60JAS. Figurent en vert les gènes qui sont induits chez *atg5* mais réprimés dans le mutant présenté et figurent en rouge les gènes surexprimés chez les deux mutants.

La comparaison du transcriptome d'*atg5* avec les données transcriptomiques disponibles dans les bibliothèques publiques sur des mutants est réalisée grâce à l'utilisation du logiciel Genevestigator. Cette comparaison a été faite en utilisant la liste des cent premiers gènes surexprimés dans le mutant *atg5*. Comme le montre la figure 44, les génotypes peuvent être séparés en deux groupes. Les plantes du premier groupe présentent un profil transcriptomique semblable à celui d'*atg5* : les gènes surexprimés dans *atg5* le sont aussi dans les mutants cités. Ce groupe inclut *cpr5*, *cpr5-npr1* ainsi que *mkk1/mkk2*. *Cpr5* est un mutant qui forme spontanément des lésions et *mkk1/mkk2* est un mutant qui exprime de façon constitutive les gènes induits par l'acide salicylique. Les plantes du second groupe ont un profil transcriptomique opposé à celui d'*atg5* : les gènes surexprimés chez *atg5* sont sous-exprimés dans ces plantes. Ce groupe comprend notamment *pad4* et *eds1*. *PAD4* et *EDS1* codent des protéines lipases qui fonctionnent dans la résistance aux maladies (Feys *et al.*, 2001). *EDS1* est essentiel à l'élaboration de la HR et les deux gènes *EDS1* et *PAD4* sont tous les deux requis pour l'accumulation d'acide salicylique (Feys *et al.*, 2001).

Ces observations montrent un lien étroit entre l'autophagie et la gestion des signaux de mort cellulaire notamment la signalisation par l'acide salicylique (même sans l'attaque d'un pathogène)

Kohki Yoshimoto (Yoshimoto, 2010) a révélé que la mort cellulaire observée chez les mutants d'autophagie est dépendante de la voie de signalisation de l'acide salicylique. Le matériel végétal qu'il a produit, c'est-à-dire les doubles mutants *atg5.sid2* et *atg5.NahG*, et que nous avons utilisé dans une partie de ce travail (pages 48 à 62) permet de discriminer les effets associés à la mort cellulaire précoce et le processus d'autophagie (Yoshimoto *et al.*, 2009). Il nous faut alors nous demander si les effets que nous avons observés au niveau du métabolisme ne sont pas la cause d'une mauvaise gestion des signaux de mort cellulaire liés à la surproduction de l'acide salicylique ou encore des ROS. En perspective de ce travail, il serait intéressant de refaire certaines analyses métaboliques présentée dans cette thèse sur du matériel végétal *atg5.sid2* et *atg5.NahG* afin de discriminer les effets associés à la mort cellulaire et ceux qui sont associés au déficit d'autophagie.

IV. CONCLUSION

Les plantes sont des organismes statiques et tributaires des ressources minérales présentes dans leur rhizosphère. La remobilisation des nutriments est un processus qui permet une économie nutritionnelle et un recyclage de macro- et micro - nutriments qui sont le plus souvent limitants. Le rôle du démantèlement des chloroplastes au cours de ce processus est très important pour le recyclage de l'azote, puisque ceux-ci contiennent la majeure partie des protéines foliaires et qu'à un moment ou à un autre les plantes perdent leurs feuilles et donc une partie de leurs chloroplastes. Bien que les protéines chloroplastiques soient une source majeure pour le recyclage de l'azote foliaire, leur mécanisme de dégradation est mal connu. L'autophagie, processus de dégradation vésiculaire a été proposé comme mécanisme participant au recyclage des nutriments, notamment en situation de carence ou de limitation en azote.

Basée dans un premier temps sur l'étude des flux d'azote entre la rosette et les graines par l'utilisation du marquage à l'isotope stable ^{15}N chez des mutants d'autophagie, cette thèse a permis de montrer l'implication de l'autophagie dans la remobilisation de l'azote. Les mutants d'autophagie présentent une sénescence précoce, caractérisée par le jaunissement des feuilles. Ce phénotype est annulé lorsque les mutants d'autophagie sont croisés avec des mutants de synthèse de l'acide salicylique. Afin de discriminer l'effet de la mort cellulaire sur la remobilisation de l'azote de l'effet du déficit dans le processus d'autophagie, les expérimentations de marquage ont été également réalisées sur des mutants d'autophagie incapables de synthétiser l'acide salicylique comme le sauvage (*atg5.sid2* et *atg5.NahG*). Ainsi, nous avons pu montrer que malgré une récupération d'un phénotype non sénescant similaire à la plante sauvage, ces mutants ne recouvrent pas la totalité de leur capacité de recyclage et de remobilisation de l'azote. Ainsi, le mécanisme d'autophagie s'avère être une étape essentielle dans la remobilisation de l'azote au niveau plante entière.

La thèse s'est alors penchée sur les dysfonctionnements susceptibles d'engendrer des défauts de remobilisation en menant une étude fonctionnelle des mutants d'autophagie. De profondes perturbations métaboliques ont été mises en évidence,

notamment l'élévation du rapport C/N, un marqueur révélateur de l'état physiologique de la plante. L'analyse approfondie des mutants a montré qu'ils sont plus riches en protéines, en acides aminés ou encore en ARNs. À l'inverse, ils sont pauvres en sucres solubles et insolubles ou encore en anthocyanes.

Les analyses métabolomiques et transcriptomiques ont révélé des bouleversements d'une part dans la composition en composés pariétaux et d'autre part dans l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de ces composés. Une approche intéressante serait d'analyser plus en détail les perturbations des composés pariétaux par une analyse FTIR (Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier) ou en GC-MS.

La présence de produits d'une dégradation incomplète des protéines GS et rubisco témoigne du fait que la dégradation de ces deux protéines a été initiée dans le chloroplaste sous l'action des ROS mais que le processus de protéolyse est resté incomplet par l'absence sans doute du transport des produits vers la vacuole. Ce constat s'est accompagné de l'observation d'un bouleversement des niveaux d'activités protéasiques et d'une modification considérable de l'expression de nombreux gènes codant les protéases et inhibiteurs de protéases. Il apparaît donc que l'autophagie régule le bon fonctionnement de la protéolyse cellulaire à plusieurs niveaux : en acheminant des composés vers la vacuole mais aussi en contrôlant les contenus en protéases. Cet aspect mérite d'être étudié en abordant l'étude de la régulation des protéases au niveau biochimique, moléculaire et cellulaire et en complétant l'étude des mutants d'autophagie par la recherche de certains mutants de protéases ou d'inhibiteur de protéases. D'ors et déjà, un candidat potentiel nous paraissant intéressant est l'homologue chez *Arabidopsis* de l'inhibiteur BnD22 décrit chez le Colza (Desclos *et al.*, 2008). En effet BnD22, détecté chez le colza, apparaît à la fois significativement et inversement corrélé au niveau de sénescence foliaire et au niveau de remobilisation de l'azote. La forte induction de BnD22 dans les mutants d'autophagie pourrait éventuellement participer à leur inefficacité de remobilisation. Dans ce cadre, il serait également intéressant de réaliser un protéome de chloroplastes par électrophorèse bidimensionnelle afin de détecter éventuellement d'autres produits de dégradation. J'ai fait, au cours de ma thèse, des préparations de chloroplastes qui pourront servir à cette analyse.

Du fait, peut être, que la remobilisation de l'azote est affectée chez les mutants d'autophagie, l'assimilation de l'azote semble elle être suffisamment efficace, comme en

témoignent les fortes concentrations en azote mesurées dans leurs graines et dans leurs parties végétatives. La surexpression du gène codant la nitrate réductase (NR) dans les mutants et la plus forte activité GS semblent abonder en ce sens. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant dans un premier temps de mesurer l'activité NR et le niveau des transcrits des transporteurs de nitrate et d'ammonium au niveau racinaire. Il serait également indispensable, dans un second temps, de déterminer l'efficacité d'absorption du nitrate chez ces plantes en effectuant un marquage cumulé au nitrate ^{15}N .

Au travers de notre étude des contenus protéiques par western blots, nous avons observé que l'autophagie semble être sélective, ciblant certaines protéines plutôt que d'autres. La caractérisation de la nature des protéines cibles est un élément essentiel pour la compréhension du rôle de l'autophagie au niveau cellulaire, au cours du développement et en réponse au stress. L'étude du protéome des mutants d'autophagie par électrophorèse bidimensionnelle serait tout particulièrement intéressante. Plus ambitieux serait d'isoler des autophagosomes afin d'en analyser le contenu. Nous avons pu constater que les protéines ribosomales semblent être des cibles privilégiées de l'autophagie avec toutefois une sélectivité assez stricte pour certaines sous-unités. La recherche des signatures ou des mécanismes permettant cette sélectivité est sans doute l'une des perspectives les plus attrayantes dans la poursuite de ce travail.

Enfin, nous avons pu constater que les mutants d'autophagie accumulent des produits toxiques et semblent manquer de facteurs antioxydants. Ces plantes sont vulnérables à l'action des signaux de mort cellulaire (ROS ou acide salicylique) et l'autophagie semble être importante dans la gestion des signaux de stress et dans la survie cellulaire. Afin de déterminer si les perturbations métaboliques observées ne sont pas les effets indirects d'un déficit dans la gestion des signaux de mort, il serait intéressant de mener une nouvelle étude métabolique comme nous l'avons fait dans la première sous partie avec les doubles mutants affectés à la fois dans les processus d'autophagie et dans la synthèse d'acide salicylique.

Une partie de cette thèse s'est également intéressée à la régulation de l'autophagie dans les racines et en réponse à l'apport d'azote. Nous avons montré que le niveau d'expression du gène *AtTOR* ainsi que l'activité d'AtTOR régule le processus d'autophagie. Les cibles présumées de AtTOR, ATG1 et ATG13 ne sont pas connues à ce jour chez *Arabidopsis* même si trois homologues pour ATG1 et deux homologues pour

ATG13 ont été identifiés sur la base de leur séquence chez Arabidopsis. Toute l'étude de ces cibles potentielles d'AtTOR reste à mener. Bien qu'ayant isolé les mutants pour chacun des gènes ATG1 et ATG13, l'étude fonctionnelle reste à faire. Une caractérisation biochimique ainsi que fonctionnelle par complémentation de mutants de levure serait également envisageable.

En rapport direct avec la thématique de mon groupe, qui s'intéresse plus particulièrement aux mécanismes de recyclage de l'azote, connaître les acteurs impliqués dans le contrôle de l'autophagie, en réponse à la sénescence ou au stress azoté, serait une piste pour modifier et moduler l'activité autophagique à façon, et ainsi améliorer l'efficacité de remobilisation de l'azote et donc la productivité végétale. Ce projet est un enjeu tout à fait actuel, dans un contexte mondial d'augmentation de la population et de stagnation des rendements. Le colza, qui appartient à la famille des Brassicacées comme Arabidopsis, est une plante de grande culture sur laquelle il serait intéressant de transférer les savoirs acquis lors de cette thèse. En effet, le colza est une plante très demandeuse d'azote mais celle-ci remobilise mal son azote, en relarguant beaucoup trop lors de la chute de ses feuilles sénescentes. Dans un souci d'amélioration de l'efficacité de remobilisation de l'azote, il serait intéressant de voir si la surexpression de l'autophagie à la sénescence par l'introgession d'une fusion traductionnelle promoteurSAG12-ATG5 permet d'augmenter la remobilisation de l'azote chez cette plante.

V. MATÉRIELS & MÉTHODES

A. Matériel végétal

1. Les mutants d'autophagie

Plusieurs mutants d'autophagie ont été utilisés pour les expérimentations de marquage ainsi que l'analyse physiologique, métabolique et transcriptomique. Les mutants *atg5-1* et *atg9-2* nous ont été fournis par professeur Yoshinori Oshumi (Chiba University, Japon) et la plante transgénique RNAi-ATG18a nous a été fournie par Professeur Diane Bassham (Xiong *et al.*, 2005).

2. Les doubles mutants : autophagie et acide salicylique

Les doubles mutants *atg5.sid2* et *atg5.NahG* utilisés dans l'étude de la remobilisation ont été fournis par Docteur Kohki Yoshimoto (Yoshimoto *et al.*, 2009).

3. Les plantes transgéniques *AtTOR* et *ScFKBP12*

Les plantes transgéniques *AtTOR* et *ScFKBP12* ont été générées au laboratoire (Deprost *et al.*, 2007).

4. Les fusions et les croisements

La plante transgénique GFP-ATG8f a été fournie par Gad Galili (Weizmann Institute of Science, Israël). Les fusions traductionnelles GFP-ATG8e et RFP-ATG8e ont été réalisées au laboratoire, ainsi que la transformation des différentes lignées d'*AtTOR*. Les croisements entre la plante transgénique GFP-ATG8f et les différentes lignées d'*AtTOR* ont également été réalisés au laboratoire.

	2mM NO ₃ ⁻	10mM NO ₃ ⁻
Phosphate	0,25mM	0,25mM
Sulfate	0,25mM	0,25mM
Magnesium	0,25mM	0,25mM
Sodium	0,20mM	0,20mM
Potassium	2,75mM	5,25mM
Calcium	0,50mM	2,50mM
Ions chlorure	0,70mM	0,25mM
Fer-EDTA	10mg.mL ⁻¹	10mg.mL ⁻¹
Micro-éléments	1mL.L ⁻¹	1mL.L ⁻¹

Tableau 3. Composition des solutions nutritives.

La solution mère de micro-éléments est composée de : 10mM MnSO₄, 24mM H₃BO₃, 0,9mM CuSO₄, 0,04mM (NH₄)₆Mo₇O₂₄.

B. Conditions de culture

1. Culture en conditions contrôlées

Afin de répondre aux questions portant sur le métabolisme des plantes, dans la seconde partie de ce travail, les plantes ont été cultivées sur deux conditions de nutrition azotée. La condition limitante en azote contient 2mM de nitrate et la condition pléthorique contient 10mM de nitrate. Toutes ces expérimentations, menées en cinétique, ont été réalisées sur du sable. Les graines sont stratifiées pendant deux jours, à 4°C et à l'obscurité. Les graines sont ensuite semées à raison d'une plante par pot en 10mM de nitrate et six plantes par pot en 2mM de nitrate, et les plantes cultivées en jours courts (8 heures de jour / 16 heures de nuit). L'éclairage est assuré par des lampes à mercure et la PPF (Photosynthetic Photon Flux Density) est de $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. La température est définie précisément en fonction du jour et de la nuit : 21°C le jour et 17°C la nuit. L'hygrométrie de la chambre de culture est maintenue à 80%. Les arrosages sont effectués 3 fois par semaine par immersion pendant 2 heures dans la solution nutritive dont les compositions sont décrites dans le tableau 3.

Des prélèvements de la rosette entière ont été effectués 30 jours après le semis puis toutes les semaines. Le matériel végétal récolté est conservé à -80°C avant que les analyses ne soient faites.

2. Culture sur sable pour le marquage ^{15}N

Afin de déterminer si les mutants d'autophagie sont affectés dans la remobilisation de l'azote des rosettes vers les graines puis de savoir si ce défaut est dû à une sénescence trop précoce, des expériences de marquages ont été réalisées sur les plantes sauvages, mutantes et les double mutants. Les plantes ont été cultivées sur du sable, à raison d'une plante par pot, en jours courts, avec une hygrométrie maintenue à 80% et sous une irradiation de $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Les plantes sont immergées tous les deux jours, soit dans une solution nutritive à 2mM de nitrate (condition limitante en azote), soit dans une solution nutritive à 10mM de nitrate (condition riche en azote) dont les compositions sont décrites dans le tableau 3. Le marquage a été réalisé sur deux périodes successives de 24 heures aux 40^{ème} et 42^{ème} jours de culture. Le marquage se fait par immersion des barquettes contenant les plantes dans une solution nutritive dont

le KNO_3 est remplacé par du K^{15}NO_3 enrichi à 10%. Après le marquage, les pots sont immergés et rincés plusieurs fois à l'eau afin d'éliminer l'azote marqué résiduel puis les plantes sont arrosées de nouveau avec la solution nutritive non marquée. Trois semaines après le marquage, les plantes sont transférées en jours longs (16 heures de jour/8 heures de nuit) afin d'induire la floraison. Après séchage des plantes, les tissus aériens (rosette, hampe florale, siliques) ont été séparés des graines et représentent deux lots pour l'analyse ultérieure des transferts d'azote.

3. Culture *in vitro*

Pour l'observation des corps autophagiques et des autophagosomes dans des racines d'*Arabidopsis*, les plantules ont été cultivées *in vitro*, sur boîtes verticales. Les graines sont d'abord rincées dans une solution d'éthanol pendant une minute. Puis, elles sont désinfectées dans une solution de stérilisation (5%NaClO ; 0,1%Tween 20 ; QSP eau) pendant 5 minutes. Les graines sont ensuite rincées quatre fois avec de l'eau stérile et laissées dans la dernière eau de rinçage. Elles sont ensuite stratifiées pendant au moins 2 jours, à 4°C et à l'obscurité. Les graines sont semées sur des boîtes contenant un milieu MS (Murashige and Skoog Plant Salt Mixture), 1% saccharose, 0,4% gelrite. Les boîtes sont placées à la verticale dans une chambre de culture en jours continus, à 23°C et 20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ d'intensité lumineuse.

C. Marquage isotopique à l'azote 15

Les échantillons végétaux sous forme de poudre sèche très finement broyée sont pesés dans des nacelles d'aluminium. Le système utilisé pour déterminer la concentration totale en azote ainsi que l'enrichissement en ^{15}N de ces échantillons comprend un analyseur élémentaire (EA 3000, Euro Vector, Milan) couplé à un spectromètre de masse isotopique (IsoPrime, GV Instruments, Manchester) qui permet de mesurer les rapports isotopiques. Les dosages ont été effectués au Laboratoire d'Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutritions N,C,S de Caen avec qui nous sommes en collaboration. La détermination du contenu en azote et l'abondance en ^{15}N a été effectuée selon la

méthode décrite par Diaz *et al.* (2008) et Masclaux-Daubresse & Chardon (2011). Les calculs sont détaillés dans l'article.

Détermination des pourcentages en C et N total

Les échantillons végétaux sous forme de poudre sèche très finement broyée sont pesés dans des nacelles d'étain puis injectés dans un analyseur élémentaire (Thermo).

D. Extractions et dosages métaboliques

1. Analyse de la composition individuelle en acides aminés et dosage de l'ammonium

Les acides aminés ont été extraits par homogénéisation à froid de 50mg de matière fraîche broyée dans 500 μ L de SSA (5-sulfosalicylic acid) 2% m/v. Après centrifugation (15min, 13000rpm, 4°C), les surnageants maintenus dans la glace ou stockés à -80°C, ont servi au dosage des fonctions NH₂ selon la méthode colorimétrique de Rosen (1957), au dosage de l'ammonium ainsi qu'au dosage des acides aminés individuels par HPLC. Les extraits contenant les acides aminés ont été amenés à pH2,2 par l'ajout de quelques μ L de LiOH saturant avant d'être injectés dans l'analyseur Amino Tac JLC-500/V (JEOL, Croissy sur Seine, France) pour la séparation des différents acides aminés et leur détection par réaction avec la ninhydrine.

Le dosage de l'ammonium a été réalisé sur ces mêmes extraits selon la méthode colorimétrique de Berthelot (1859).

2. Dosage des sucres solubles et de l'amidon

Les métabolites hydrosolubles comme les sucres, les ions ou encore les acides aminés ont été extraits à l'éthanol à froid à partir de 50mg de matériel frais finement broyés (Orsel *et al.*, 2004). L'extraction se fait par ajout successif d'éthanol. La première étape est l'ajout de 500 μ L d'éthanol 80% aux 50mg de matière fraîche. Après incubation pendant une heure à 4°C, les échantillons sont centrifugés (14000 rpm, 15min, 4°C) et les surnageants prélevés. 250 μ L d'éthanol 80% sont ensuite ajoutés sur le culot. Après incubation pendant une heure à 4°C, les échantillons sont centrifugés (14000 rpm,

15min, 4°C), les surnageants sont prélevés et ajoutés au surnageant précédent. Puis, 250 µL d'éthanol 50% sont ajoutés sur le culot. Après incubation pendant une heure à 4°C, les échantillons sont centrifugés (14000 rpm, 15min, 4°C), les surnageants sont prélevés et ajoutés aux précédents. A la fin, 250µL d'eau sont ajoutés. Après incubation pendant une heure à 4°C, les échantillons sont centrifugés (14000 rpm, 15min, 4°C), les surnageants sont prélevés et ajoutés au surnageant précédent. Les échantillons sont conservés à -20°C avant le dosage des sucres et des acides aminés.

Le glucose, le fructose et le saccharose ont été dosés à partir de ces extraits hydroalcooliques, avec le kit saccharose/D-glucose/D-fructose (ROCHE) suivant le protocole du fournisseur. Le dosage de l'amidon a été effectué sur les culots restants après l'extraction réalisée pour les analyses du métabolome par GC-MS. Les culots secs sont repris dans 150µL de MOPS 50mM pH7 + 5µL (15U) d'une solution d'amylase thermostable (Roche) à 4mg.mL⁻¹. Les échantillons sont ensuite placés à 100°C au bain-marie pendant six minutes. Après refroidissement, 200µL de tampon acétate de sodium 0,2M pH4,8 + 0,5mg d'amyloglucosidase (35U ; Fluka) sont ajoutés. Les échantillons sont ensuite vortexés et incubés pendant cinq heures à 50°C pour digérer l'amidon en molécules de glucose. A pH7, l'amidon est hydrolysé par l'amylase en maltose et D-glucose et à pH4,8, le maltose est hydrolysé par l'amyloglucosidase en D-glucose. Après centrifugation (10min, 14000rpm), le surnageant est récupéré et le glucose ainsi libéré est dosé par le kit D-glucose de ROCHE suivant le protocole du fournisseur.

3. Dosage des chlorophylles

Pour le dosage des chlorophylles (Arnon, 1949), 50µL de l'extrait brut issu de la première étape de l'extraction hydroalcoolique ont été prélevés et 950µL d'acétone 80% sont ajoutés. Le mélange est laissé pendant 24 heures à 4°C et à l'obscurité. Puis les DO des échantillons sont mesurées aux différentes longueurs d'ondes suivante :

Chlorophylle a : µg chlorophylle a/cuve = $\Delta DO_{663} \times 12,7 - \Delta DO_{645} \times 2,69$

Chlorophylle b : µg chlorophylle b/cuve = $\Delta DO_{649} \times 22,9 - \Delta DO_{663} \times 4,68$

Chlorophylles totales : mg chlorophylles/cuve = $\Delta DO_{652}/36$

4. Dosage des anthocyanes

La méthode décrite par Diaz *et al.* (2006) permet la détermination du contenu des anthocyanes totaux. Les anthocyanes sont extraits à partir de matériel frais finement broyé dans un mélange (80% Méthanol ; 19% eau ; 1% HCl 12N) durant 24 heures, à 4°C et à l'obscurité. Après 24 heures, l'extrait est centrifugé pendant 10 minutes à 4°C pour enlever les débris cellulaires. L'absorbance du surnageant est mesurée à 525nm.

5. Métabolome par GC-MS

L'analyse du profilage métabolique a été réalisée selon la méthode décrite par Fiehn *et al.* (Fiehn, 2006) par la Plateforme de Chimie du Végétal au sein du centre. L'extraction a été réalisée sur environ 20mg de matériel frais finement broyé dans l'azote liquide. Un mL d'une solution eau :chloroforme :méthanol (1 :1 :2,5) a été ajouté pour chaque échantillon. Les échantillons ont été agités pendant 10 minutes à 4°C puis centrifugés. 900µL du surnageant ont été prélevés et mélangés avec 20µL de ribitol (200µL.mL⁻¹ méthanol) qui est le standard interne. Cinquante µL du mélange réactionnel ont été séchés sous vide. Les échantillons secs ont été dissous avec 10µL de méthoxylamine et incubés à 28°C pendant 90min sous agitation continue. Puis, 90µL de N-méthyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (MSTFA) ont été ajoutés et le mélange a été incubé à 37°C pendant 30min. Avant l'injection, les échantillons ont été laissés à température ambiante pendant 150min. Les échantillons (1µL) ont été injectés dans une chromatographie gazeuse Agilent 7890A couplée à un spectromètre de masse Agilent 5975C.

E. Dosages d'activités enzymatiques

1. Glutamine Synthétase

Le dosage de l'activité GS est réalisé en plaque 96 puits par mesure de l'apparition d'un sidérophore, le gamma-glutamylhydroxamate (AGH), produit de la réaction catalysée par la GS entre le glutamate et un analogue de l'ammonium,

l'hydroxylamine (NH₂OH). Ce sidérophore chélate le fer, ce qui lui donne une couleur brune dont l'absorption est mesurée à 540nm selon la méthode décrite par O'Neal and Joy (O'Neal & Joy, 1973). L'activité de cette enzyme a été mesurée sur 150mg de matière fraîche extrait dans 1,2mL de tampon (Tris-HCl 25mM pH7,6, β-mercaptoéthanol 2‰, MgCl₂ 1mM, Na-EDTA 1mM). Ensuite, 50μL d'extraits enzymatiques sont mélangés à 20μL de mélange réactionnel pH7,6 (MgSO₄ 150mM, glutamate 600mM, NH₂OH 45mM, Na-EDTA 30mM, leupeptine 2μM), 20μL d'ATP (60mM pH7,6) et 60μL de Tris-HCl 50mM pH7,6. Pour le blanc, le volume d'ATP est remplacé par le même volume de Tris-HCl 50mM pH7,6. La réaction se déroule à 30°C pendant 30min et est stoppée par ajout de 150μL de solution STOP (FeCl₃ 370mM, TCA 200mM, HCl 5,5%). Après centrifugation, la DO est mesurée à 540nm sur les surnageants.

2. Glutamate Déshydrogénase

Le dosage de l'activité GDH aminante ou désaminante est réalisée sur les mêmes extraits enzymatiques que ceux utilisés pour le dosage de l'activité GS par mesure, respectivement, de la disparition ou de l'apparition du cofacteur de la réaction, le NADH (Masclaux *et al.*, 2000). Les dosages s'effectuent sur 50μL d'extraits enzymatiques auxquels s'ajoutent 250μL de tampon de réaction A pH8 (α-KG 13mM, (NH₄)₂SO₄ 50mM, NADH 0,25mM, CaCl₂ 1mM, Tris-HCl 100mM) ou de tampon D pH9 (glutamate 35mM, CaCl₂ 1mM, NAD 0,25mM, Tris-HCl 100mM) pour les dosages dans le sens de l'amination ou de la désamination respectivement. Les blancs correspondent au même mélange mais sans cofacteurs. La DO est mesurée à 340nm.

3. Activités protéasiques

Les protéines ont été extraites à partir de 100mg de matériel frais dans 1mL de tampon Tris HCl 50mM pH7,5, 0,1% β-mercaptoéthanol. Le mélange a été vortexé pendant 1min30 puis centrifugé pendant 10 minutes à 14000rpm. Le surnageant a été récupéré dans un nouveau tube. Le substrat utilisé pour doser les activités protéines est une solution d'azocaséine 4mg.mL⁻¹. Le dosage a été réalisé en micro-plaque. Chaque puits contient 80μL d'azocaséine, 80μL d'extrait enzymatique et 80μL d'un tampon à pH4,5 (Na+acétate-acide acétique 250mM) ou pH7,5 (Tris-HCl 250mM). Pour le puits

Anticorps	Quantité de protéines déposée	Pourcentage d'acrylamide
Rubisco	10µg	8%
GOGAT	20µg	7%
Pepc	20µg	7%
L13	20µg	15%
S14	20µg	12%
S6	20µg	15%
IDH	20µg	12%
GDH	20µg	10%
GS	10µg	8%

Tableau 4. Anticorps utilisés pour les western-blots.

témoin, l'extrait enzymatique a été remplacé par du tampon d'extraction. La plaque est mise à incuber pendant trois heures à 37°C. Pour arrêter la réaction, 50µL de TCA 50% ont été ajoutés et la plaque a été laissée pendant trente minutes sur la glace. La plaque a ensuite été centrifugée pendant 10 minutes à 4000rpm et à 4°C. Le surnageant a été transféré dans une nouvelle plaque et la DO a été mesurée à 340nm (Roymacauley *et al.*, 1992).

F. Biochimie

1. Extraction des protéines et dosage par la méthode de Bradford

Les protéines ont été extraites à partir de 150mg de matériel frais dans un tampon Hepes 50mM, MgCl₂ 2mM, EDTA 0,5mM, Triton X-100 0,1%, DTT 2mM, leupeptine 2µM ou bien dans le tampon utilisé pour l'extraction lors du dosage de l'activité GS. Les protéines solubles sont dosées par la méthode de Bradford (1970) grâce au réactif « BIORAD protein assay ». Les protéines sont ensuite dénaturées pendant 10 minutes à 95°C après ajout de dénaturant de Laemmli (80mM Tris HCl pH6,8, 2% SDS, 10% Glycérol, 5% β-mercaptoéthanol, 0,04% Bleu de Bromophénol) à raison de 1/5 du volume total (Laemmli, 1970; Bradford, 1976).

2. SDS-Page et western-Blot

Les protéines dénaturées ont été séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes SDS-PAGE dans un gel d'acrylamide. Une quantité égale de protéines est déposée dans chaque puits. Le pourcentage d'acrylamide a été adapté à la taille de la protéine d'intérêt. Le tableau 4 résume les différents anticorps utilisés et le pourcentage d'acrylamide dans chaque gel de running.

Après transfert liquide des protéines dénaturées sur membrane de nitrocellulose grâce à l'application d'un courant de 36V constant pendant plus de douze heures, les membranes ont été saturées à la BSA (Bovine Serum Albumin) diluée dans du tampon TBS (Tris-HCl 10mM pH7,4, NaCl 150mM) pendant 4 heures sous agitation puis incubées avec les anticorps primaires pendant la nuit à 4°C et sous agitation (Tableau 4).

Après rinçages, les membranes ont été incubées avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase.

L'activité peroxydase est révélée soit grâce au chloro-naphtol ou grâce à un kit de chemiluminescence (Biorad).

G. Extraction d'acides nucléiques

1. Extraction d'ADN pour le géotypage des croisements

Les échantillons sont broyés dans un tampon d'extraction : TrisHCl 200mM pH7,5, EDTA 25mM pH8, NaCl 250mM, SDS 0,5% suivant la méthode décrite par Edwards (1991). Les acides nucléiques sont ensuite précipités par ajout d'un volume d'isopropanol puis, après centrifugation, lavés à l'éthanol 70%. Les culots sont enfin séchés puis repris dans de l'eau stérile.

2. Extraction des ARN totaux

Deux méthodes ont été utilisées pour extraire les ARNs.

Pour l'hybridation sur les puces Affymetrix réalisée au Japon, les ARN totaux ont été extraits selon la méthode décrite par Verwoerd *et al.* (1989). Les ARNs ont été extraits à partir d'environ 300mg de matériel frais finement broyé dans l'azote liquide dans 1mL de tampon d'extraction chaud (80°C) dont la composition est : phénol pH4,5 ; LiCl 0,1M ; TrisHCl 100mM pH8 ; EDTA 10mM ; SDS1%. Le mélange a été vortéxé pendant 30 secondes puis 500µL d'un mélange chloroforme-isoamylalcohol (24 :1) ont été ajoutés et le mélange vortéxé de nouveau pendant 30 secondes. Après centrifugation (5min, 14000rpm, 4°C) la phase aqueuse supérieure a été prélevée avec minutie et mélangée avec un volume de LiCl 4M. Les ARNs ont été laissés à précipiter toute la nuit à 4°C. Le jour suivant, les ARNs ont été précipités par centrifugation à 14000rpm pendant 30 minutes et à 4°C. Le surnageant a été éliminé et le culot d'ARNs repris dans 600µL d'eau traitée DEPC. Les échantillons ont été aliquotés en trois tubes (200µL chacun) et les ARNs conservés par ajout de 20µL d'acétate de sodium 3M et 400µL d'éthanol. Ils ont été conservés à -80°C jusqu'à leur expédition au Japon. La veille du départ, les

échantillons ont été centrifugés (20min, 14000rpm, 4°C), le surnageant éliminé et le culot recouvert de 1,5mL d'éthanol absolu. Les ARNs se conservent ainsi pendant 48 heures. Arrivés sur place, les échantillons ont été centrifugés et le culot repris dans 20µL d'eau stérile (Verwoerd *et al.*, 1989).

Pour le dosage des ARNs et la réalisation des gels, les ARNs totaux ont été extraits à partir de 50mg de matière fraîche broyée dans l'azote liquide et homogénéisée avec 1mL de Trizol (Invitrogen). Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, 200µL de chloroforme ont été ajoutés. Les échantillons ont été agités pendant 15 secondes et incubés 3 à 5 minutes à température ambiante avant d'être centrifugés à 12 000g pendant 15 minutes à 4°C. La phase supérieure aqueuse a été récupérée et les ARNs précipités pendant 10 minutes à température ambiante par l'ajout préalable de 500µL d'isopropanol. Après centrifugation (12 000g, 15 min, 4°C), le surnageant a été éliminé, le culot d'ARNs rincé par 1mL d'éthanol 75% et centrifugé de nouveau (7 500g, 5 min, 4°C). L'éthanol a été retiré, le culot d'ARNs séché puis re-suspendu dans 50µL d'eau stérile. La concentration en ARNs a été déterminée au Nanodrop.

A 5µL de l'extrait précédent ont été ajoutés 5µL de tampon de charge ARN. Le mélange a été dénaturé par chauffage à 70°C pendant 9 minutes. Les ARNs ont ensuite été chargés dans un gel d'agarose à 1,2%.

H. Transcriptome

Les analyses transcriptomiques ont été réalisées avec des puces ATH1 d'Affymetrix (GeneChip Arabidopsis ATH1 Genome Array ; CA, USA) contenant plus de 22500 sondes qui sont des étiquettes spécifiques correspondant à plus de 24000 gènes. Toute l'analyse a été réalisée au Japon, dans le cadre d'une collaboration avec Kohki Yoshimoto.

La qualité des ARNs a été contrôlée par des puces Agilent.

I. Cytologie et microscopie

1. Coloration au carmin aluné vert d'iode

Cette technique, mise au point par Mirande en 1920, permet une coloration différentielle de la lignine et de la cellulose. La lignine est colorée en vert tandis que la cellulose est colorée en rose. La solution de Carmin aluné-vert d'iode se prépare de la façon suivante : Faire chauffer 1L d'eau distillée et y ajouter doucement 50g de poudre de Carmin. Laisser bouillir pendant 15 à 20min en laissant l'évaporation se faire. Filtrer cette solution et mesurer le volume récupéré. Dissoudre 1g de vert d'iode dans 100mL et ajouter le volume adéquate de cette solution pour qu'il représente 1/10 de la solution finale de Carmin aluné-vert d'iode.

Les échantillons végétaux fraîchement prélevés ont d'abord été inclus dans de l'agarose 8%. Puis, les blocs formés sont coupés en coupes de 70 μ m d'épaisseur à l'aide d'un vibratome. Les coupes ont ensuite été immergées dans un bain d'hypochlorite de sodium (eau de Javel) pendant 20 minutes puis rincées plusieurs fois à l'eau. Elles sont ensuite passées dans un bain d'acide acétique dilué de moitié dans de l'eau pendant une minute. Les coupes rincées plusieurs fois à l'eau ont été colorées avec la solution de carmino-vert pendant 5 minutes. Les coupes colorées ont été montées entre lame et lamelle, et observées en microscopie photonique (DMRB, Leica).

2. Bleu Trypan

Le Bleu Trypan permet de visualiser les cellules mortes des tissus végétaux. Les feuilles ou la rosette des mutants d'autophagie et du génotype sauvage ont été prélevés, mis dans la solution de bleu trypan (10mL glycérol, 10mL acide lactique, 9,43mL phénol, 10mg bleu trypan) et bouillis pendant une minute. Les échantillons ont ensuite été laissés dans cette solution pendant 24 heures. Après ce temps, la solution de marquage est remplacée par du chloral hydrate à 1g.mL⁻¹. Les échantillons peuvent être conservés dans le chloral hydrate. Pour être observé, les échantillons sont montés entre lame et lamelles. Les photographies ont été prises grâce à une loupe binoculaire couplée d'une caméra.

VI. Références bibliographiques

- Adami, A., Garcia-Alvarez, B., Arias-Palomo, E., Barford, D. & Llorca, O. (2007) Structure of TOR and its complex with KOG1. *Molecular Cell*, **27**, 509-516.
- Arnon, D.I. (1949) COPPER ENZYMES IN ISOLATED CHLOROPLASTS. POLYPHENOLOXIDASE IN BETA VULGARIS. *Plant physiology*, **24**, 1-15.
- Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G. & Ktistakis, N.T. (2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology*, **182**, 685-701.
- Baena-Gonzalez, E., Rolland, F., Thevelein, J.M. & Sheen, J. (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, **448**, 938-U910.
- Bassham, D.C. (2009) Function and regulation of macroautophagy in plants. *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Cell Research*, **1793**, 1397-1403.
- Baxter, B.K., Abeliovich, H., Zhang, X., Stirling, A.G., Burlingame, A.L. & Goldfarb, D.S. (2005) Atg19p ubiquitination and the cytoplasm to vacuole trafficking pathway in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 39067-39076.
- Beau, I., Mehrpour, M. & Codogno, P. (2011) Autophagosomes and human diseases. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **43**, 460-464.
- Begona Herrera-Rodriguez, M., Maldonado, J.M. & Perez-Vicente, R. (2006) Role of asparagine and asparagine synthetase genes in sunflower (*Helianthus annuus*) germination and natural senescence. *Journal of Plant Physiology*, **163**, 1061-1070.
- Bonguebartelsman, M. & Phillips, D.A. (1995) NITROGEN STRESS REGULATES GENE-EXPRESSION OF ENZYMES IN THE FLAVONOID BIOSYNTHETIC-PATHWAY OF TOMATO. *Plant Physiology and Biochemistry*, **33**, 539-546.
- Boya, P., Gonzalez-Polo, R.A., Casares, N., Perfettini, J.L., Dessen, P., Larochette, N., Metivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., Pierron, G., Codogno, P. & Kroemer, G. (2005) Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, **25**, 1025-1040.
- Bradford, M.M. (1976) RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Breitling, R., Armengaud, P., Amtmann, A. & Herzyk, P. (2004) Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *Febs Letters*, **573**, 83-92.
- Buchanan-Wollaston, V. (1997) The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany*, **48**, 181-199.

- Buchanan-Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., Mathas, E., Navabpour, S., Page, T. & Pink, D. (2003) The molecular analysis of leaf senescence - a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal*, **1**, 3-22.
- Chardon, F., Barthelemy, J., Daniel-Vedele, F. & Masclaux-Daubresse, C. (2010) Natural variation of nitrate uptake and nitrogen use efficiency in *Arabidopsis thaliana* cultivated with limiting and ample nitrogen supply. *Journal of Experimental Botany*, **61**, 2293-2302.
- Chen, S., Rehman, S.K., Zhang, W., Wen, A., Yao, L. & Zhang, J. (2010) Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, **1806**, 220-229.
- Chiba, A., Ishida, H., Nishizawa, N.K., Makino, A. & Mae, T. (2003) Exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. *Plant Cell Physiol*, **44**, 914-921.
- Choi, J.W., Chen, J., Schreiber, S.L. & Clardy, J. (1996) Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science*, **273**, 239-242.
- Chung, T.J., Suttangkakul, A. & Vierstra, R.D. (2009) The ATG autophagic conjugation system in maize: ATG transcripts and abundance of the ATG8-lipid adduct are regulated by development and nutrient availability. *Plant Physiology*, **149**, 220-234.
- Crespo, J.L., Diaz-Troya, S. & Florencio, F.J. (2005) Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, **139**, 1736-1749.
- Cuervo, A.M. & Dice, J.F. (1996) A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*, **273**, 501-503.
- Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicolaie, M., Bedu, M., Robaglia, C. & Meyer, C. (2007) The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *Embo Reports*, **8**, 864-870.
- Desclos, M., Dubousset, L., Etienne, P., Le Caherec, F., Satoh, H., Bonnefoy, J., Ourry, A. & Avice, J.C. (2008) A proteomic profiling approach to reveal a novel role of *Brassica napus* drought 22 kD/water-soluble chlorophyll-binding protein in young leaves during nitrogen remobilization induced by stressful conditions. *Plant Physiol*, **147**, 1830-1844.
- Diaz, C., Lemaitre, T., Christ, A., Azzopardi, M., Kato, Y., Sato, F., Morot-Gaudry, J.F., Le Dily, F. & Masclaux-Daubresse, C. (2008) Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in *Arabidopsis* under low nitrogen nutrition. *Plant Physiology*, **147**, 1437-1449.
- Diaz, C., Saliba-Colombani, V., Loudet, O., Belluomo, P., Moreau, L., Daniel-Vedele, F., Morot-Gaudry, J.-F. & Masclaux-Daubresse, C. (2006) Leaf yellowing and anthocyanin accumulation are two genetically independent strategies in response to nitrogen limitation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, **47**, 74-83.
- Diaz-Troya, S., Florencio, F.J. & Crespo, J.L. (2008) Target of rapamycin and LST8 proteins associate with membranes from the endoplasmic reticulum in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, **7**, 212-222.

- Dice, J.F., Terlecky, S.R., Chiang, H.L., Olson, T.S., Isenman, L.D., Short-Russell, S.R., Freundlieb, S. & Terlecky, L.J. (1990) A selective pathway for degradation of cytosolic proteins by lysosomes. *Seminars in cell biology*, **1**, 449-455.
- Do, C.B. & Cormier, F. (1991) EFFECTS OF LOW NITRATE AND HIGH SUGAR CONCENTRATIONS ON ANTHOCYANIN CONTENT AND COMPOSITION OF GRAPE (VITIS-VINIFERA L) CELL-SUSPENSION. *Plant Cell Reports*, **9**, 500-504.
- Doelling, J.H., Walker, J.M., Friedman, E.M., Thompson, A.R. & Vierstra, R.D. (2002) The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 33105-33114.
- Estelle, M. (2001) Proteases and cellular regulation in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**, 254-260.
- Esther Perez-Perez, M. & Crespo, J.L. (2010) Autophagy in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Autophagy*, **6**, 562-563.
- Esther Perez-Perez, M., Florencio, F.J. & Crespo, J.L. (2010) Inhibition of Target of Rapamycin Signaling and Stress Activate Autophagy in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, **152**, 1874-1888.
- Farre, J.-C., Manjithaya, R., Mathewson, R.D. & Subramani, S. (2008) PpAtg30 tags peroxisomes for turnover by selective autophagy. *Developmental Cell*, **14**, 365-376.
- Feild, T.S., Lee, D.W. & Holbrook, N.M. (2001) Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood. *Plant Physiology*, **127**, 566-574.
- Feller, U. & Fischer, A. (1994) NITROGEN-METABOLISM IN SENESCING LEAVES. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **13**, 241-273.
- Feys, B.J., Moisan, L.J., Newman, M.A. & Parker, J.E. (2001) Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *Embo Journal*, **20**, 5400-5411.
- Fiehn, O. (2006) Metabolite profiling in *Arabidopsis*. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **323**, 439-447.
- Foyer, C.H. & Noctor, G. (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*, **119**, 355-364.
- Gibon, Y., Blasing, O.E., Palacios-Rojas, N., Pankovic, D., Hendriks, J.H.M., Fisahn, J., Hohne, M., Gunther, M. & Stitt, M. (2004) Adjustment of diurnal starch turnover to short days: depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following light period. *Plant Journal*, **39**, 847-862.
- Guiamet, J.J., Pichersky, E. & Nooden, L.D. (1999) Mass exodus from senescing soybean chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, **40**, 986-992.
- Guiboileau, A., Sormani, R., Meyer, C. & Masclaux-Daubresse, C. (2010) Senescence and death of plant organs: Nutrient recycling and developmental regulation. *Comptes Rendus Biologies*, **333**, 382-391.

- Hailey, D.W., Rambold, A.S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P.K. & Lippincott-Schwartz, J. (2010) Mitochondria Supply Membranes for Autophagosome Biogenesis during Starvation. *Cell*, **141**, 656-667.
- Hanaoka, H., Noda, T., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S. & Ohsumi, Y. (2002) Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an Arabidopsis autophagy gene. *Plant Physiology*, **129**, 1181-1193.
- Hayward, A.P., Tsao, J. & Dinesh-Kumar, S.P. (2009) Autophagy and plant innate immunity: Defense through degradation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **20**, 1041-1047.
- He, C. & Klionsky, D.J. (2009) Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annual Review of Genetics*, **43**, 67-93.
- Hensel, L.L., Grbic, V., Baumgarten, D.A. & Bleecker, A.B. (1993) DEVELOPMENTAL AND AGE-RELATED PROCESSES THAT INFLUENCE THE LONGEVITY AND SENESCENCE OF PHOTOSYNTHETIC TISSUES IN ARABIDOPSIS. *Plant Cell*, **5**, 553-564.
- Hillwig, M.S., Contento, A.L., Meyer, A., Ebany, D., Bassham, D.C. & MacIntosh, G.C. (2011) RNS2, a conserved member of the RNase T2 family, is necessary for ribosomal RNA decay in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 1093-1098.
- Hoch, W.A., Singaas, E.L. & McCown, B.H. (2003) Resorption protection. Anthocyanins facilitate nutrient recovery in autumn by shielding leaves from potentially damaging light levels. *Plant Physiology*, **133**, 1296-1305.
- Hofius, D., Schultz-Larsen, T., Joensen, J., Tsitsigiannis, D.I., Petersen, N.H.T., Mattsson, O., Jorgensen, L.B., Jones, J.D.G., Mundy, J. & Petersen, M. (2009) Autophagic Components Contribute to Hypersensitive Cell Death in Arabidopsis. *Cell*, **137**, 773-783.
- Hortensteiner, S. & Feller, U. (2002) Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 927-937.
- Houtz, R.L. & Portis, A.R. (2003) The life of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase-posttranslational facts and mysteries. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **414**, 150-158.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T. & Ohsumi, Y. (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, **408**, 488-492.
- Inoue, Y., Suzuki, T., Hattori, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y. & Moriyasu, Y. (2006) AtATG genes, homologs of yeast autophagy genes, are involved in constitutive autophagy in Arabidopsis root tip cells. *Plant and Cell Physiology*, **47**, 1641-1652.
- Ishida, H., Nishimori, Y., Sugisawa, M., Makino, A. & Mae, T. (1997) The large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase is fragmented into 37-kDa and 16-kDa polypeptides by active oxygen in the lysates of chloroplasts from primary leaves of wheat. *Plant and Cell Physiology*, **38**, 471-479.
- Ishida, H., Shimizu, S., Makino, A. & Mae, T. (1998) Light-dependent fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in chloroplasts isolated from wheat leaves. *Planta*, **204**, 305-309.

- Ishida, H. & Yoshimoto, K. (2008) Chloroplasts are partially mobilized to the vacuole by autophagy. *Autophagy*, **4**, 961-962.
- Ishida, H., Yoshimoto, K., Izumi, M., Reisen, D., Yano, Y., Makino, A., Ohsumi, Y., Hanson, M.R. & Mae, T. (2008) Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiology*, **148**, 142-155.
- Ishizaki, K., Schauer, N., Larson, T.R., Graham, I.A., Fernie, A.R. & Leaver, C.J. (2006) The mitochondrial electron transfer flavoprotein complex is essential for survival of Arabidopsis in extended darkness. *Plant Journal*, **47**, 751-760.
- Jossier, M., Bouly, J.-P., Meimoun, P., Arjmand, A., Lessard, P., Hawley, S., Grahame Hardie, D. & Thomas, M. (2009) SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, **59**, 316-328.
- Jung, C.H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N.M. & Kim, D.-H. (2010) mTOR regulation of autophagy. *Febs Letters*, **584**, 1287-1295.
- Kanki, T. & Klionsky, D.J. (2009) Atg32 is a tag for mitochondria degradation in yeast. *Autophagy*, **5**, 1201-1202.
- Kanki, T. & Klionsky, D.J. (2010) The molecular mechanism of mitochondria autophagy in yeast. *Molecular Microbiology*, **75**, 795-800.
- Kapri-Pardes, E., Naveh, L. & Adam, Z. (2007) The thylakoid lumen protease Deg1 is involved in the repair of photosystem II from photoinhibition in Arabidopsis. *Plant Cell*, **19**, 1039-1047.
- Kato, Y., Murakami, S., Yamamoto, Y., Chatani, H., Kondo, Y., Nakano, T., Yokota, A. & Sato, F. (2004) The DNA-binding protease, CND41, and the degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in senescent leaves of tobacco. *Planta*, **220**, 97-104.
- Kaushik, S., Bandyopadhyay, U., Sridhar, S., Kiffin, R., Martinez-Vicente, M., Kon, M., Orenstein, S.J., Wong, E. & Cuervo, A.M. (2011) Chaperone-mediated autophagy at a glance. *Journal of Cell Science*, **124**, 495-499.
- Kiel, J.A.K.W. (2010) Autophagy in unicellular eukaryotes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, **365**, 819-830.
- Kinnersley, A.M. & Turano, F.J. (2000) Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **19**, 479-509.
- Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T. & Ohsumi, Y. (2000) The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Journal of Cell Biology*, **151**, 263-275.
- Klein, L., Muenz, C. & Luenemann, J.D. (2010) Autophagy-mediated antigen processing in CD4(+) T cell tolerance and immunity. *Febs Letters*, **584**, 1405-1410.

- Kon, M. & Cuervo, A.M. (2010) Chaperone-mediated autophagy in health and disease. *Febs Letters*, **584**, 1399-1404.
- Kraft, C., Deplazes, A., Sohrmann, M. & Peter, M. (2008) Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nature Cell Biology*, **10**, 602-610.
- Kraft, C. & Peter, M. (2008) Is the Rsp5 ubiquitin ligase involved in the regulation of ribophagy? *Autophagy*, **4**, 838-840.
- Kraft, C., Reggiori, F. & Peter, M. (2009a) Selective types of autophagy in yeast. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, **1793**, 1404-1412.
- Kraft, C., Roberts, T., Kijanska, M., Kaspar, S., Zbinden, C. & Peter, M. (2009b) Selective degradation of ribosomes by a ubiquitin-dependent mechanism in yeast and mammalian cells. *Autophagy*, **5**, 901-901.
- Kroemer, G., Marino, G. & Levine, B. (2010) Autophagy and the Integrated Stress Response. *Molecular Cell*, **40**, 280-293.
- Krupinska, K. & Humbeck, K. (2008) Senescence processes and their regulation. *Plant Biology*, **10**, 1-3.
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhiya, T. & Mizushima, N. (2004) The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, **432**, 1032-1036.
- Kwon, S.I., Cho, H.J., Jung, J.H., Yoshimoto, K., Shirasu, K. & Park, O.K. (2010) The Rab GTPase RabG3b functions in autophagy and contributes to tracheary element differentiation in Arabidopsis. *Plant Journal*, **64**, 151-164.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lam, H.M., Wong, P., Chan, H.K., Yam, K.M., Chen, L., Chow, C.M. & Coruzzi, G.M. (2003) Overexpression of the ASN1 gene enhances nitrogen status in seeds of Arabidopsis. *Plant Physiology*, **132**, 926-935.
- Lemaitre, T., Gaufichon, L., Boutet-Mercey, S., Christ, A. & Masclaux-Daubresse, C. (2008) Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in Arabidopsis thaliana Wassilewskija accession. *Plant and Cell Physiology*, **49**, 1056-1065.
- Levine, B. & Kroemer, G. (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, **132**, 27-42.
- Levine, B., Mizushima, N. & Virgin, H.W. (2011) Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*, **469**, 323-335.
- Li, W., Yang, Q. & Mao, Z. (2011) Chaperone-mediated autophagy: machinery, regulation and biological consequences. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **68**, 749-763.
- Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H. & Levine, B. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, **402**, 672-676.

- Lichtenthaler, H.K., Prenzel, U., Douce, R. & Joyard, J. (1981) LOCALIZATION OF PRENYLQUINONES IN THE ENVELOPE OF SPINACH-CHLOROPLASTS. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **641**, 99-105.
- Lillo, C., Lea, U.S. & Ruoff, P. (2008) Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant Cell and Environment*, **31**, 587-601.
- Liu, Y. & Bassham, D.C. (2010) TOR Is a Negative Regulator of Autophagy in Arabidopsis thaliana. *Plos One*, **5**.
- Liu, Y., Schiff, M., Czymmek, K., Tallozy, Z., Levine, B. & Dinesh-Kumar, S.P. (2005) Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell*, **121**, 567-577.
- Liu, Y., Xiong, Y. & Bassham, D.C. (2009) Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy*, **5**, 954-963.
- MacIntosh, G.C. & Bassham, D.C. (2011) The connection between ribophagy, autophagy and ribosomal RNA decay. *Autophagy*, **7**, 662-663.
- Mae, T., Makino, A. & Ohira, K. (1983) CHANGES IN THE AMOUNTS OF RIBULOSE BISPHOSPHATE CARBOXYLASE SYNTHESIZED AND DEGRADED DURING THE LIFE-SPAN OF RICE LEAF (ORYZA-SATIVA-L). *Plant and Cell Physiology*, **24**, 1079-1086.
- Makino, A. & Osmond, B. (1991) EFFECTS OF NITROGEN NUTRITION ON NITROGEN PARTITIONING BETWEEN CHLOROPLASTS AND MITOCHONDRIA IN PEA AND WHEAT. *Plant Physiology*, **96**, 355-362.
- Manjithaya, R., Anjard, C., Loomis, W.F. & Subramani, S. (2010) Unconventional secretion of Pichia pastoris Acb1 is dependent on GRASP protein, peroxisomal functions, and autophagosome formation. *Journal of Cell Biology*, **188**, 537-546.
- Mari, M., Griffith, J., Rieter, E., Krishnappa, L., Klionsky, D.J. & Reggiori, F. (2010) An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. *Journal of Cell Biology*, **190**, 1005-1022.
- Martinez, D.E., Costa, M.L. & Guiamet, J.J. (2008) Senescence-associated degradation of chloroplast proteins inside and outside the organelle. *Plant Biol (Stuttg)*, **10 Suppl 1**, 15-22.
- Marty, F. (1978) CYTOCHEMICAL STUDIES ON GERL, PROVACUOLES, AND VACUOLES IN ROOT MERISTEMATIC CELLS OF EUPHORBIA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **75**, 852-856.
- Masclaux, C., Quillere, I., Gallais, A. & Hirel, B. (2001) The challenge of remobilisation in plant nitrogen economy. A survey of physio-agronomic and molecular approaches. *Annals of Applied Biology*, **138**, 69-81.
- Masclaux, C., Valadier, M.H., Brugiére, N., Morot-Gaudry, J.F. & Hirel, B. (2000) Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta*, **211**, 510-518.

- Masclaux-Daubresse, C. & Chardon, F. (2011) Exploring nitrogen remobilization for seed filling using natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 2131-2142.
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L. & Suzuki, A. (2010) Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany*, **105**, 1141-1157.
- Masclaux-Daubresse, C., Reisdorf-Cren, M. & Orsel, M. (2008) Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. *Plant Biology*, **10**, 23-36.
- Masclaux-Daubresse, C., Reisdorf-Cren, M., Pageau, K., Lelandais, M., Grandjean, O., Kronenberger, J., Valadier, M.H., Feraud, M., Jouglet, T. & Suzuki, A. (2006) Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. *Plant Physiology*, **140**, 444-456.
- Matile, P. & Moor, H. (1968) Vacuolation: Origin and development of the lysosomal apparatus in root-tip cells. *Planta*, **80**, 159-175.
- Matile, P., Schellenberg, M. & Peisker, C. (1992) PRODUCTION AND RELEASE OF A CHLOROPHYLL CATABOLITE IN ISOLATED SENESCENT CHLOROPLASTS. *Planta*, **187**, 230-235.
- Menand, B., Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C. & Robaglia, C. (2002) Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 6422-6427.
- Miflin, B.J. & Lea, P.J. (1982) Ammonia assimilation and amino acid metabolism. *Encyclopedia of plant physiology. New series. Volume 14A. Nucleic acids and proteins in plants. I. Structure, biochemistry and physiology of proteins [Boulter, D.; Parthier, B. (Editors)]*, 5-64.
- Miyadai, K., Mae, T., Makino, A. & Ojima, K. (1990) CHARACTERISTICS OF RIBULOSE-1,5-BISPHOSPHATE CARBOXYLASE OXYGENASE DEGRADATION BY LYSATES OF MECHANICALLY ISOLATED-CHLOROPLASTS FROM WHEAT LEAVES. *Plant Physiology*, **92**, 1215-1219.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M. & Klionsky, D.J. (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, **451**, 1069-1075.
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M. & Ohsumi, Y. (1998) A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, **395**, 395-398.
- Mizushima, N., Yoshimori, T. & Levine, B. (2010) Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell*, **140**, 313-326.
- Moulin, M., Deleu, C., Larher, F. & Bouchereau, A. (2006) The lysine-ketoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase is involved in the osmo-induced synthesis of pipercolic acid in rapeseed leaf tissues. *Plant Physiology and Biochemistry*, **44**, 474-482.
- Munne-Bosch, S. (2005) The role of alpha-tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*, **162**, 743-748.

- Nakano, R., Ishida, H., Makino, A. & Mae, T. (2006) In vivo fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species in an intact leaf of cucumber under chilling-light conditions. *Plant and Cell Physiology*, **47**, 270-276.
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y. & Ohsumi, Y. (2009) Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **10**, 458-467.
- Neufeld, T.P. (2010) TOR-dependent control of autophagy: biting the hand that feeds. *Current Opinion in Cell Biology*, **22**, 157-168.
- Noda, N.N., Ohsumi, Y. & Inagaki, F. (2010) Atg8-family interacting motif crucial for selective autophagy. *Febs Letters*, **584**, 1379-1385.
- O'Neal, D. & Joy, K.W. (1973) Glutamine synthetase of pea leaves. I. Purification, stabilization, and pH optima. *Archives of biochemistry and biophysics*, **159**, 113-122.
- Obara, K., Sekito, T. & Ohsumi, Y. (2006) Assortment of phosphatidylinositol 3-kinase complexes-Atg14p directs association of complex I to the pre-autophagosomal structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, **17**, 1527-1539.
- Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., Takahashi, I. & Ohsumi, Y. (2009a) Molecular basis of mitochondrial degradation via selective autophagy in yeast. *Autophagy*, **5**, 902-902.
- Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N. & Ohsumi, Y. (2009b) A landmark protein essential for mitophagy Atg32 recruits the autophagic machinery to mitochondria. *Autophagy*, **5**, 1203-1205.
- Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N. & Ohsumi, Y. (2009c) Mitochondria-Anchored Receptor Atg32 Mediates Degradation of Mitochondria via Selective Autophagy. *Developmental Cell*, **17**, 87-97.
- Olinares, P.D.B., Kim, J. & van Wijk, K.J. (2011) The Clp protease system; a central component of the chloroplast protease network. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, **1807**, 999-1011.
- Orsel, M., Eulenburg, K., Krapp, A. & Daniel-Vedele, F. (2004) Disruption of the nitrate transporter genes AtNRT2.1 and AtNRT2.2 restricts growth at low external nitrate concentration. *Planta*, **219**, 714-721.
- Otegui, M.S., Noh, Y.S., Martinez, D.E., Vila Petroff, M.G., Andrew Staehelin, L., Amasino, R.M. & Guiamet, J.J. (2005) Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean. *Plant Journal*, **41**, 831-844.
- Pajuelo, P., Pajuelo, E., Forde, B.G. & Marquez, A.J. (1997) Regulation of the expression of ferredoxin glutamate synthase in barley. *Planta*, **203**, 517-525.
- Palatnik, J.F., Carrillo, N. & Valle, E.M. (1999) The role of photosynthetic electron transport in the oxidative degradation of chloroplastic glutamine synthetase. *Plant Physiology*, **121**, 471-478.
- Peng, M., Hudson, D., Schofield, A., Tsao, R., Yang, R., Gu, H., Bi, Y.-M. & Rothstein, S.J. (2008) Adaptation of *Arabidopsis* to nitrogen limitation involves induction of anthocyanin synthesis which is controlled by the NLA gene. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 2933-2944.

- Phillips, A.R., Suttangkakul, A. & Vierstra, R.D. (2008) The ATG12-conjugating enzyme ATG10 is essential for autophagic vesicle formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **178**, 1339-1353.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. & Van Wees, S.C.M. (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, **5**, 308-316.
- Polge, C., Jossier, M., Crozet, P., Gissot, L. & Thomas, M. (2008) beta-Subunits of the SnRK1 Complexes Share a Common Ancestral Function Together with Expression and Function Specificities; Physical Interaction with Nitrate Reductase Specifically Occurs via AKIN beta 1-Subunit. *Plant Physiology*, **148**, 1570-1582.
- Pourtau, N., Mares, M., Purdy, S., Quentin, N., Ruel, A. & Wingler, A. (2004) Interactions of abscisic acid and sugar signalling in the regulation of leaf senescence. *Planta*, **219**, 765-772.
- Rajendran, L., Ravishankar, G.A., Venkataraman, L.V. & Prathiba, K.R. (1992) ANTHOCYANIN PRODUCTION IN CALLUS-CULTURES OF DAUCUS-CAROTA AS INFLUENCED BY NUTRIENT STRESS AND OSMOTICUM. *Biotechnology Letters*, **14**, 707-712.
- Reggiori, F., Tucker, K.A., Stromhaug, P.E. & Klionsky, D.J. (2004) The Atg1-Atg13 complex regulates *Atg9* and *Atg23* retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Developmental Cell*, **6**, 79-90.
- Reumann, S., Voitsekhovskaja, O. & Lillo, C. (2010) From signal transduction to autophagy plant cell organelles: lessons from yeast and mammals and plant-specific features. *Protoplasma*, **247**, 233-256.
- Rose, T.L., Bonneau, L., Der, C., Marty-Mazars, D. & Marty, F. (2006) Starvation-induced expression of autophagy-related genes in *Arabidopsis*. *Biology of the Cell*, **98**, 53-67.
- Roymacauley, H., Zuilyfodil, Y., Kidric, M., Thi, A.T.P. & Dasilva, J.V. (1992) EFFECT OF DROUGHT STRESS ON PROTEOLYTIC ACTIVITIES IN PHASEOLUS AND VIGNA LEAVES FROM SENSITIVE AND RESISTANT PLANTS. *Physiologia Plantarum*, **85**, 90-96.
- Sakai, Y., Oku, M., van der Klei, I.J. & Kiel, J.A.K.W. (2006) Pexophagy: Autophagic degradation of peroxisomes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, **1763**, 1767-1775.
- Scandalios, J.G. (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **38**, 995-1014.
- Shen, W., Reyes, M.I. & Hanley-Bowdoin, L. (2009) *Arabidopsis* Protein Kinases GRIK1 and GRIK2 Specifically Activate SnRK1 by Phosphorylating Its Activation Loop. *Plant Physiology*, **150**, 996-1005.
- Shin, J., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Jeon, J. & An, G. (2009) OsATG10b, an autophagosome component, is needed for cell survival against oxidative stresses in rice. *Molecules and Cells*, **27**, 67-74.
- Sivasankar, S., Rothstein, S. & Oaks, A. (1997) Regulation of the accumulation and reduction of nitrate by nitrogen and carbon metabolites in maize seedlings. *Plant Physiology*, **114**, 583-589.

- Slavikova, S., Shy, G., Yao, Y.L., Giozman, R., Levanony, H., Pietrokovski, S., Elazar, Z. & Galili, G. (2005) The autophagy-associated Atg8 gene family operates both under favourable growth conditions and under starvation stresses in Arabidopsis plants. *Journal of Experimental Botany*, **56**, 2839-2849.
- Smart, C.M., Hosken, S.E., Thomas, H., Greaves, J.A., Blair, B.G. & Schuch, W. (1995) THE TIMING OF MAIZE LEAF SENESCENCE AND CHARACTERIZATION OF SENESCENCE-RELATED CDNAS. *Physiologia Plantarum*, **93**, 673-682.
- Sormani, R., Yao, L., Menand, B., Ennar, N., Lecampion, C., Meyer, C. & Robaglia, C. (2007) Saccharomyces cerevisiae FKBP12 binds Arabidopsis thaliana TOR and its expression in plants leads to rapamycin susceptibility. *Bmc Plant Biology*, **7**.
- Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T. & Ohsumi, Y. (2001) The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *Embo Journal*, **20**, 5971-5981.
- Suzuki, K., Kubota, Y. & Ohsumi, Y. (2005) Atg protein network required for autophagy. *Cell Structure and Function*, **30**, 17-17.
- Suzuki, K. & Ohsumi, Y. (2007) Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, Saccharomyces cerevisiae. *Febs Letters*, **581**, 2156-2161.
- Thompson, A.R., Doelling, J.H., Suttangkakul, A. & Vierstra, R.D. (2005) Autophagic nutrient recycling in Arabidopsis directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. *Plant Physiology*, **138**, 2097-2110.
- Thumm, M., Egner, R., Koch, B., Schlumpberger, M., Straub, M., Veenhuis, M. & Wolf, D.H. (1994) ISOLATION OF AUTOPHAGOCYTOSIS MUTANTS OF SACCHAROMYCES-CEREVISIAE. *Febs Letters*, **349**, 275-280.
- Triantaphylides, C. & Havaux, M. (2009) Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in Plant Science*, **14**, 219-228.
- Tsukada, M. & Ohsumi, Y. (1993) ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AUTOPHAGY-DEFECTIVE MUTANTS OF SACCHAROMYCES-CEREVISIAE. *Febs Letters*, **333**, 169-174.
- Utsugi, S., Sakamoto, W., Murata, M. & Motoyoshi, F. (1998) Arabidopsis thaliana vegetative storage protein (VSP) genes: gene organization and tissue-specific expression. *Plant Molecular Biology*, **38**, 565-576.
- van der Graaff, E., Schwacke, R., Schneider, A., Desimone, M., Flugge, U.I. & Kunze, R. (2006) Transcription analysis of Arabidopsis membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiology*, **141**, 776-792.
- Vanhee, C., Zapotoczny, G., Masquelier, D., Ghislain, M. & Batoko, H. (2011) The Arabidopsis Multistress Regulator TSPO Is a Heme Binding Membrane Protein and a Potential Scavenger of Porphyrins via an Autophagy-Dependent Degradation Mechanism. *Plant Cell*, **23**, 785-805.
- Verwoerd, T.C., Dekker, B.M.M. & Hoekema, A. (1989) A SMALL-SCALE PROCEDURE FOR THE RAPID ISOLATION OF PLANT RNAS. *Nucleic Acids Research*, **17**, 2362-2362.

- Wada, S., Ishida, H., Izumi, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Mae, T. & Makino, A. (2009) Autophagy Plays a Role in Chloroplast Degradation during Senescence in Individually Darkened Leaves. *Plant Physiology*, **149**, 885-893.
- Wingler, A., Masclaux-Daubresse, C. & Fischer, A.M. (2009) Sugars, senescence, and ageing in plants and heterotrophic organisms. *Journal of Experimental Botany*, **60**, 1063-1066.
- Wittenbach, V.A., Lin, W. & Hebert, R.R. (1982) VACUOLAR LOCALIZATION OF PROTEASES AND DEGRADATION OF CHLOROPLASTS IN MESOPHYLL PROTOPLASTS FROM SENESCING PRIMARY WHEAT LEAVES. *Plant Physiology*, **69**, 98-102.
- Wullschlegel, S., Loewith, R. & Hall, M.N. (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, **124**, 471-484.
- Xiong, Y., Contento, A.L. & Bassham, D.C. (2005) AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **42**, 535-546.
- Xiong, Y., Contento, A.L. & Bassham, D.C. (2007a) Disruption of autophagy results in constitutive oxidative stress in *Arabidopsis*. *Autophagy*, **3**, 257-258.
- Xiong, Y., Contento, A.L., Nguyen, P.Q. & Bassham, D.C. (2007b) Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **143**, 291-299.
- Yamauchi, Y., Ejiri, Y. & Tanaka, K. (2002) Glycation by ascorbic acid causes loss of activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and its increased susceptibility to proteases. *Plant and Cell Physiology*, **43**, 1334-1341.
- Yang, Z. & Klionsky, D.J. (2009) An Overview of the Molecular Mechanism of Autophagy. *Autophagy in Infection and Immunity*, 1-32.
- Yang, Z.F. & Klionsky, D.J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, **22**, 124-131.
- Yi, J. & Tang, X.M. (1999) The convergent point of the endocytic and autophagic pathways in Leydig cells. *Cell Research*, **9**, 243-253.
- Yoshida, T. & Minamikawa, T. (1996) Successive amino-terminal proteolysis of the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by vacuolar enzymes from French bean leaves. *European Journal of Biochemistry*, **238**, 317-324.
- Yoshimoto, K. (2010) Plant autophagy puts the brakes on cell death by controlling salicylic acid signaling. *Autophagy*, **6**, 192-193.
- Yoshimoto, K., Hanaoka, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Noda, T. & Ohsumi, Y. (2004) Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell*, **16**, 2967-2983.
- Yoshimoto, K., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Kusano, M., Consonni, C., Panstruga, R., Ohsumi, Y. & Shirasu, K. (2009) Autophagy Negatively Regulates Cell Death by Controlling NPR1-Dependent Salicylic Acid Signaling during Senescence and the Innate Immune Response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **21**, 2914-2927.

- Yoshimoto, K., Takano, Y. & Sakai, Y. (2010) Autophagy in plants and phytopathogens. *Febs Letters*, **584**, 1350-1358.
- Yu, L., Strandberg, L. & Lenardo, M.J. (2008) The selectivity of autophagy and its role in cell death and survival. *Autophagy*, **4**, 567-573.

Annexe 1

Supplemental data: Regulation of autophagy by AtTOR



Figure S1: Roots of seven-days-old *atg5* seedlings were cut and incubated in liquid 3mM MES medium containing 1 μ M concanamycin A. No autophagic bodies can be detected even after five hours of conCA treatment.

Annexe 2

Supplemental data file.

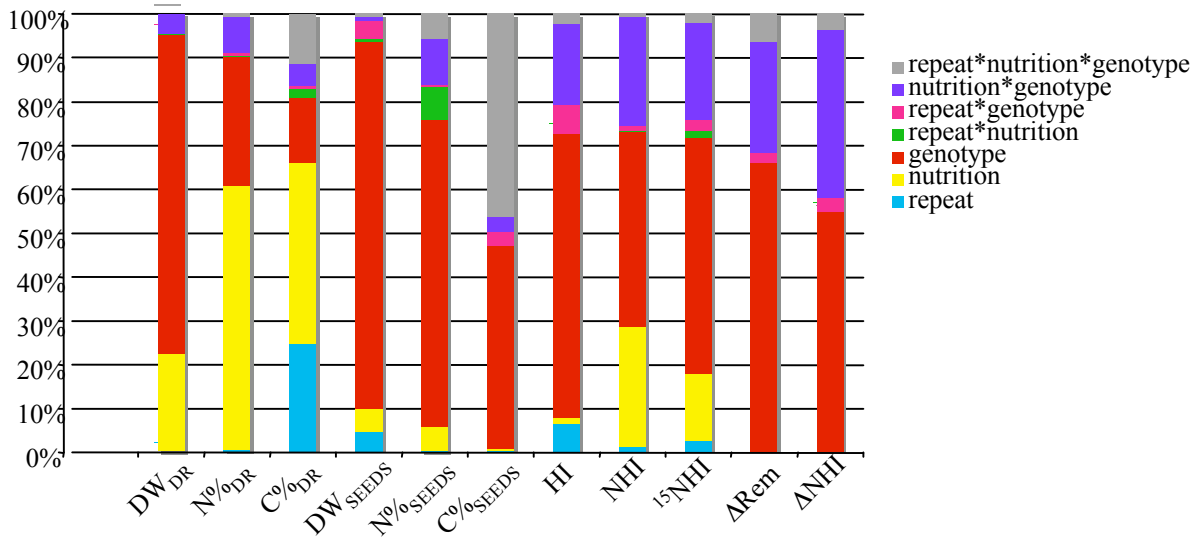
Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole plant level under both limiting and ample nitrate conditions in *Arabidopsis*.

Anne Guiboileau, Kohki Yoshimoto, Fabienne Soulay, Marie-Paule Bataillé, Jean-Christophe Avice and Céline Masclaux-Daubresse

A

LowN 2mM	DW _{DR}	N% _{DR}	C% _{DR}	DW _{SEEDS}	N% _{SEEDS}	C% _{SEEDS}	HI	NHI	¹⁵ NHI	ΔRem	ΔNHI
Repeat	ns	ns	ns	0.020	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Genotype	0.607	11.48	ns	0.131	1.606	116.2	0.047	0.364	0.364	2.63	0.650
Repeat*Genotype	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
HighN 10mM	DW _{DR}	N% _{DR}	C% _{DR}	DW _{SEEDS}	N% _{SEEDS}	C% _{SEEDS}	HI	NHI	¹⁵ NHI	ΔRem	ΔNHI
Repeat	ns	8.31	50.4	ns	ns	ns	0.051	ns	ns	ns	ns
Genotype	5.7	ns	57.2	0.34	6.4	ns	ns	ns	ns	1.01	0.434
Repeat*Genotype	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

B

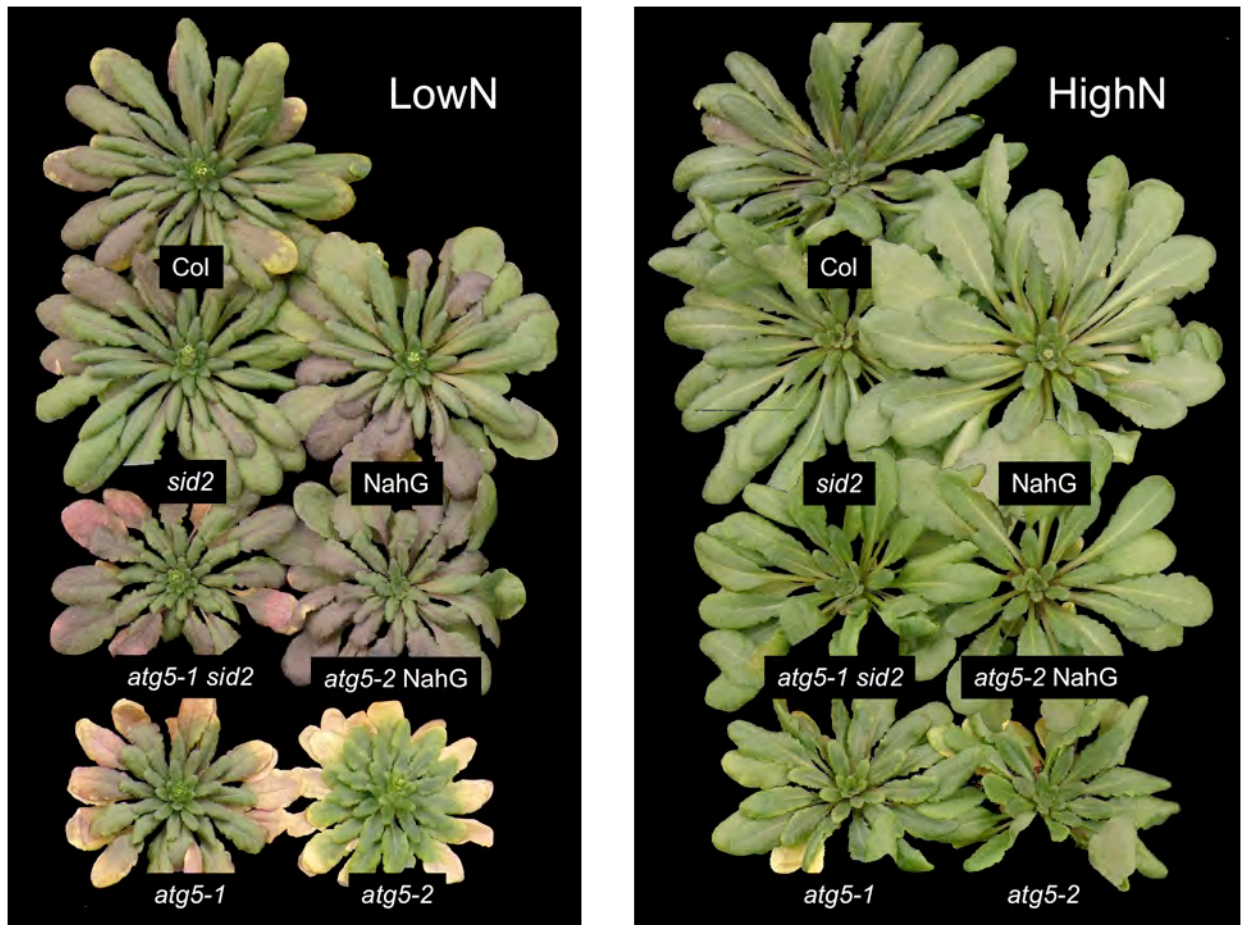


C

LowN 2mM	DW _{DR}	N% _{DR}	C% _{DR}	DW _{SEEDS}	N% _{SEEDS}	C% _{SEEDS}	HI	NHI	¹⁵ NHI	ΔRem	ΔNHI
Repeat	ns	ns	ns	21	1.7	ns	0.15	ns	ns	ns	ns
Genotype	600	99.4	ns	919	20.6	380	0.416	2.57	2.06	3.8	3.8
Repeat*Genotype	ns	ns	ns	35	1.3	380	ns	ns	ns	ns	ns
HighN 10mM	DW _{DR}	N% _{DR}	C% _{DR}	DW _{SEEDS}	N% _{SEEDS}	C% _{SEEDS}	HI	NHI	¹⁵ NHI	ΔRem	ΔNHI
Repeat	ns	ns	ns	10	0.9	ns	0.23	0.047	0.116	ns	ns
Genotype	1588	13	ns	94	7.8	539	0.63	0.081	0.023	0.827	0.225
Repeat*Genotype	ns	ns	51	7	ns	539	ns	ns	0.016	ns	ns

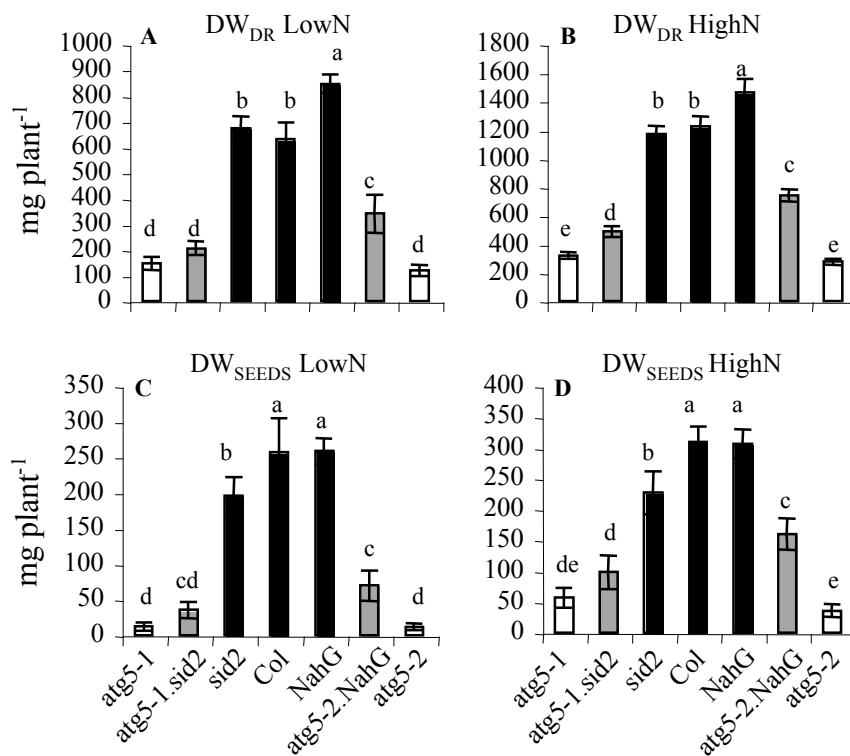
Supplemental Figure S1: Global ANOVA and ANOVA at LowN and HighN performed on the two set of experiments performed with controls and mutants

- A.** ANOVA at LowN and HighN of dry weight (DW, g), N concentration (N%, mg 100mg⁻¹ DW), C concentration (C%, mg 100mg⁻¹ DW), HI (harvest index), NHI (nitrogen harvest index), ¹⁵NHI (partition of ¹⁵N in seeds), NUE indicator (DNHI) and Remobilization indicator (DRem) in wild type Col, *RNAi-18*, *atg9-2* and *atg5-1* under HighN and LowN nutritions. Sums of square are presented for genotype effects, repeat effects and genotype*repeat interactions. Only significant effects (P<0.05) are presented.
- B.** Representation of global ANOVA of dry weight (DW, g), N concentration (N%, mg 100mg⁻¹ DW), C concentration (C%, mg 100mg⁻¹ DW), HI (harvest index), NHI (nitrogen harvest index), ¹⁵NHI (partition of ¹⁵N in seeds), NUE indicator (DNHI) and Remobilization indicator (DRem) in wild type Col, *sid2*, *NahG*, *atg5-1*, *atg5-2*, *atg5-1.sid2* and *atg5-2.NahG* under LowN and HighN nutritions. Sums of square are presented for genotype effects, nutrition effects, repeat effects genotype*repeat, genotype*nutrition, nutrition*repeat and genotype*nutrition*repeat interactions. Only significant effects (P<0.05) are presented.
- C.** ANOVA at LowN or HighN of dry weight (DW, g), N concentration (N%, mg 100mg⁻¹ DW), C concentration (C%, mg 100mg⁻¹ DW), C/N ratio, ¹⁵N enrichment (E%; ¹⁵N/N as %), HI (harvest index), NHI (nitrogen harvest index), ¹⁵NHI (partition of ¹⁵N in seeds), NUE indicator (DNHI) and Remobilization indicator (DRem) in wild type Col, *sid2*, *NahG*, *atg5-1*, *atg5-2*, *atg5-1.sid2* and *atg5-2.NahG* under LowN or HighN nutrition. Sums of square are presented for genotype effects, repeat effects and genotype*repeat interactions. Only significant effects (P<0.05) are presented.

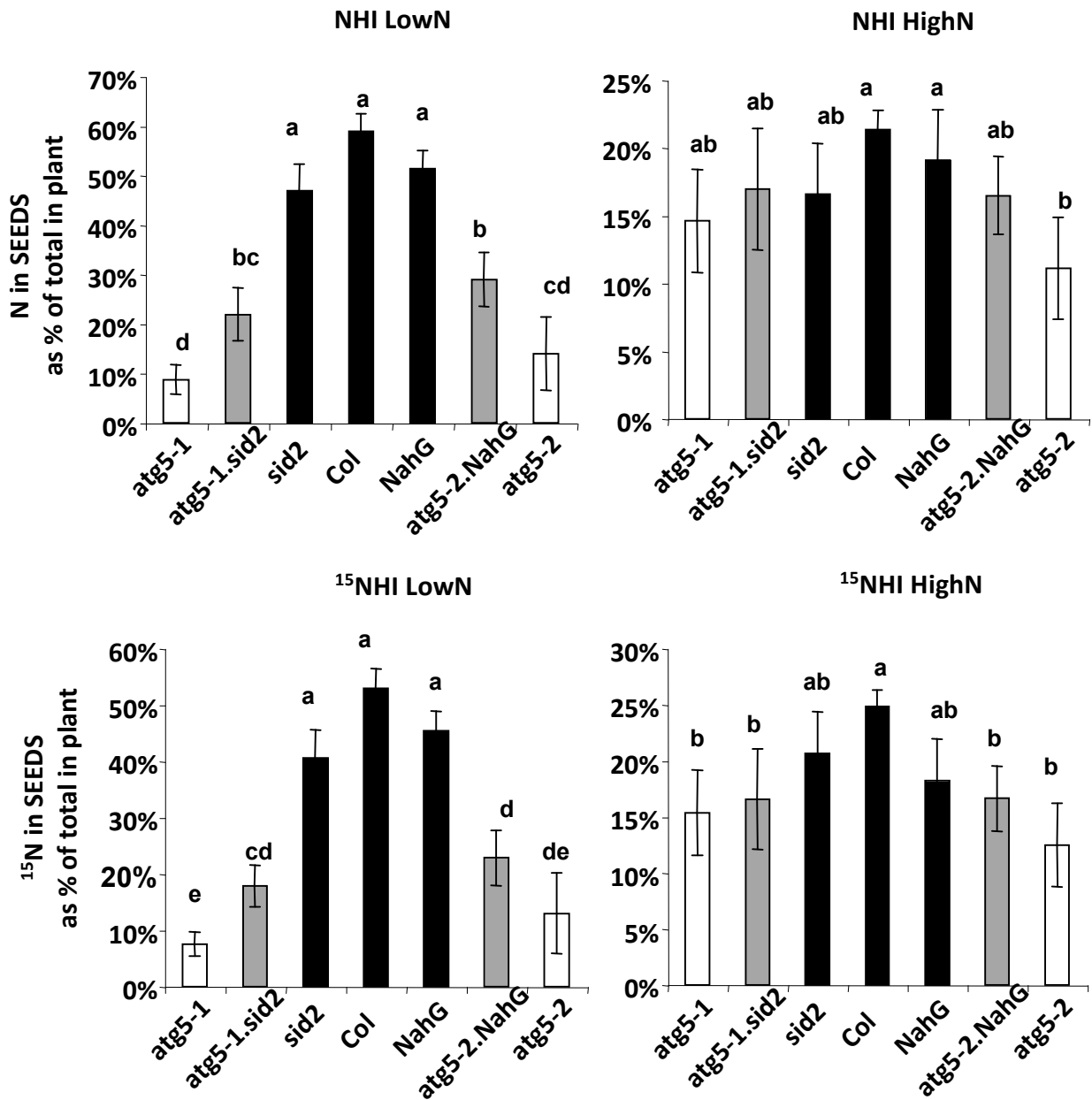


Supplemental Figure S2: Senescence phenotype of autophagy-defective and salicylic acid defective mutants under nitrate limiting conditions.

The *atg5-1*, *atg5-2*, *atg5-1.sid2*, *atg5-2.NahG*, *sid2*, *NahG* and ColArabidopsis lines were grown on sand under LowN (left) and HighN (right) in short-day (8h light/16h dark) condition for 56 days after sowing (DAS), then transferred to long-day (16h light/8h dark) until harvest. Phenotypes of rosettes at 70 DAS under LowN are shown. Under HighN condition no differential senescing phenotype or biomass phenotype can be observed between mutants and wild types.

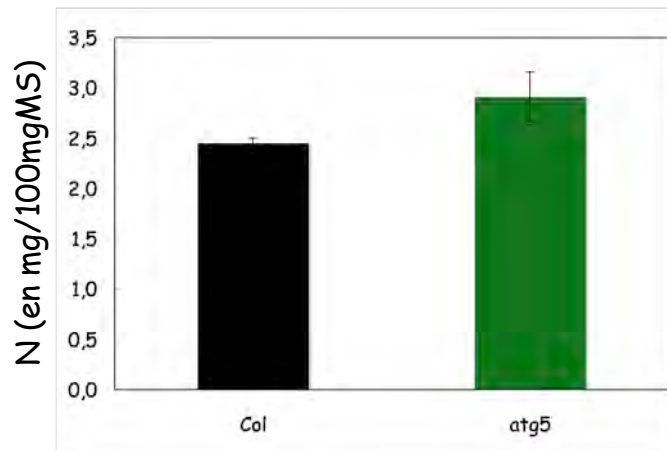


Supplemental Figure S3: Comparison of biomass and yield in stay-green autophagy mutants under nitrate limiting (LowN) and nitrate rich (HighN) conditions. The dry weight of the dry remains (DR) (**A**, **B**) and the dry weight of total seeds (SEEDS) (**C**,**D**) of controls (dark bar), autophagy mutants (white bars) and stay-green *atg5-1.sid2* and *atg5-2.NahG* autophagy mutants (grey bars) were measured and computed at LowN (**A**,**C**) and HighN (**B**,**D**). Data are the adjusted means and standard deviations from two biological repeats numbering six plants each. The different letters indicate values significantly different at $p < 0.05$ ($n=12$) as determined using XLSTAT ANOVA Newman-Keuls (SNK) comparison.



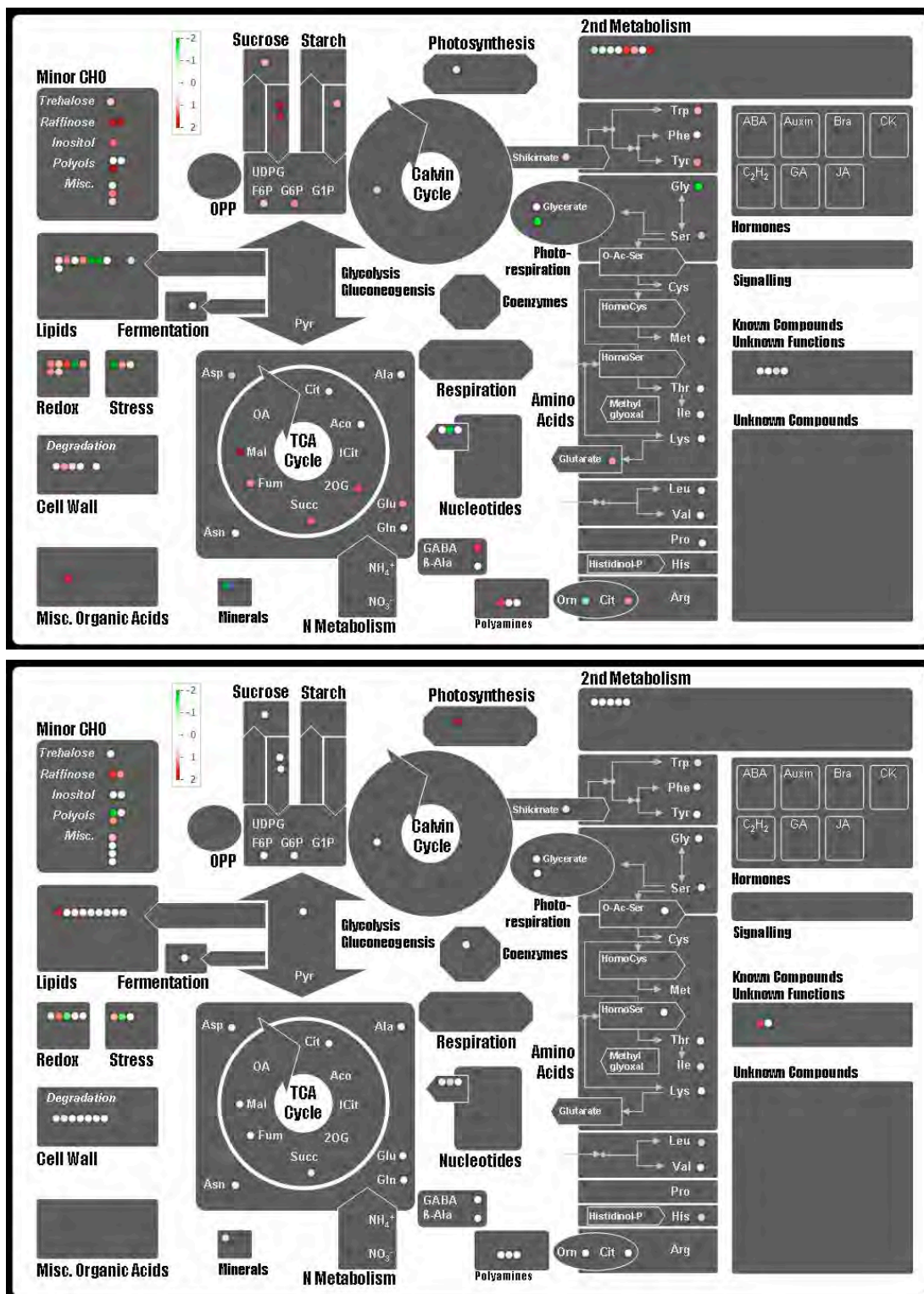
Supplemental Figure S4: Total nitrogen and ¹⁵N partitionings are decreased in autophagy simple and double mutants. Values estimated at LowN and HighN are adjusted means from two biological repeats with six individual plants each (n=12). Black lines indicate standard deviations. The different letters indicate values significantly different at p<0.05 as determined using XLSTAT ANOVA Newman-Keuls (SNK) comparison.

Annexe 3



Annexe 3. Concentrations en azote dans les rosettes du mutant *atg5* et du sauvage sur 2 mM et à 60JAS

Annexe 4



Annexe 4. Représentations Mapman des contenus métaboliques du mutant *atg5* par rapport au sauvage.

(A) Représentation Mapman de la comparaison du contenu en métabolites d'*atg5* par rapport au sauvage sur 2mM et à 30JAS lors d'une première expérimentation.

(B) Représentation Mapman de la comparaison du contenu en métabolites d'*atg5* par rapport au sauvage sur 2mM et à 30JAS lors d'une deuxième expérimentation.

Annexe 5. Analyse transcriptomique des gènes codant des protéases ou inhibiteurs de protéases

Liste des gènes induits ou réprimés dans les rosettes du mutant *atg5* par rapport au sauvage à 60JAS sur 2mM.

L'analyse est réalisée selon la méthode du produit des rangs de Breitling (Breitling *et al.*, 2004).

Les colonnes représentent les rapports des intensités *atg5/Col* sur deux expériences.

RP down/up est le rang du « produit des rangs » et indique le rang du gène (de 1 à 22810) dans la liste de gènes sous/sur-exprimés. 1 étant le rang du gène le plus sous/sur-exprimés respectivement pour rank RP down et rank RP up, et 22810 étant le rang du gène le moins sous/sur-exprimés respectivement pour rank RP down et rank RP up.

FDR est le « False Discovery Rate » et donne une idée de la pvalue du rang du produits des rangs. Une FDR inférieure à 10^{-3} a été prise en compte dans nos analyses.

Annexe 5

	atg5 vs Col repeat 1	atg5 vs Col repeat 2	Rank RP Up	FDR Up	Rank RP Down	FDR Down	
AT1G73260	trypsin and protease inhibitor family protei	51,91	161,59	25	1,2108E-05	22789	0,00437001
AT3G04320	[AT3G04320, endopeptidase inhibitor];[AT	26,62	60,06	65	2,469E-05	22750	0,00435424
AT3G22600	protease inhibitor/seed storage/lipid transf	8,65	52,41	145	5,0394E-05	22609	0,00428333
AT3G19390	cysteine proteinase, putative / thiol protea	38,64	4,19	240	0,00010059	22454	0,00420294
AT5G10760	aspartyl protease family protein	8,08	12,68	323	0,00013881	22525	0,00423869
AT3G51330	aspartyl protease family protein	5,99	7,35	551	0,00022854	22341	0,00415438
AT5G55450	protease inhibitor/seed storage/lipid transf	3,03	10,17	664	0,00025835	22043	0,00402764
AT1G18280	protease inhibitor/seed storage/lipid transf	2,66	8,20	834	0,00032773	21846	0,00396767
AT1G49050	aspartyl protease family protein	4,17	4,09	983	0,00036606	21996	0,00401312
AT5G45570	Ulp1 protease family protein	1,34	13,68	999	0,00036849	20416	0,00349877
AT4G04460	aspartyl protease family protein	7,69	1,93	1068	0,00038678	21705	0,00391202
AT2G15325	protease inhibitor/seed storage/lipid transf	5,46	2,70	1072	0,00038698	21891	0,0039816
AT5G04250	OTU-like cysteine protease family protein	5,95	2,04	1219	0,00042944	21677	0,00390073
AT5G24820	aspartyl protease family protein	4,36	2,36	1332	0,00046641	21684	0,00390262
AT1G37020	Ulp1 protease family protein	5,79	1,75	1380	0,00047699	21449	0,00382359
AT3G22570	protease inhibitor/seed storage/lipid transf	2,23	3,93	1498	0,00050407	21416	0,00380575
AT4G21980	APG8A (AUTOPHAGY 8A); APG8 activating	2,98	2,78	1525	0,00051248	21535	0,00385496
AT5G38170	protease inhibitor/seed storage/lipid transf	2,25	2,92	1783	0,00057494	21260	0,00375729
AT2G39320	OTU-like cysteine protease family protein	3,07	2,09	1814	0,00057649	21315	0,00377839
AT2G17760	aspartyl protease family protein	2,07	3,03	1838	0,00058712	21174	0,00372727
AT4G22460	protease inhibitor/seed storage/lipid transf	4,43	1,40	2019	0,00063332	20824	0,00359633
AT5G43060	cysteine proteinase, putative / thiol protea	2,25	2,35	2033	0,00063866	21115	0,00370135
AT3G51360	aspartyl protease family protein	5,69	1,12	2196	0,00068451	19909	0,00328842
AT1G64830	aspartyl protease family protein	5,54	1,07	2409	0,00073899	19455	0,00314413
AT5G22850	aspartyl protease family protein	2,33	1,72	2460	0,00075231	20801	0,00358755
AT3G59080	aspartyl protease family protein	1,78	2,25	2466	0,00075467	20668	0,0035458
AT1G73780	protease inhibitor/seed storage/lipid transf	0,58	7,39	2709	0,00079799	11716	0,00175245
AT3G22260	OTU-like cysteine protease family protein	2,35	1,49	2820	0,00082158	20521	0,0034836
AT3G47060	ftsH7 (FtsH protease 7); ATP-dependent p	1,85	1,70	2969	0,00085418	20431	0,00345345
AT1G05450	protease inhibitor/seed storage/lipid transf	1,67	1,88	2993	0,0008572	20324	0,00342412
AT2G38900	serpin protease inhibitor, potato inhibitor I	2,88	1,24	3012	0,00085834	20052	0,00334277
AT4G12490	protease inhibitor/seed storage/lipid transf	0,67	5,56	3135	0,00087722	13607	0,0019839
AT2G42980	aspartyl protease family protein	1,33	2,31	3184	0,00089021	19753	0,0032384
AT5G15250	FTSH6 (FTSH PROTEASE 6); ATP-depende	3,32	1,11	3187	0,00089075	19493	0,00315857
AT5G46900	[AT5G46900, protease inhibitor/seed stora	0,28	6,77	3188	0,0008915	5474	0,00105986
AT1G73560	protease inhibitor/seed storage/lipid transf	0,26	6,78	3198	0,00089256	5094	0,00104835
AT1G17860	trypsin and protease inhibitor family protei	1,56	1,85	3238	0,00089955	20095	0,00335453
AT5G05110	cysteine protease inhibitor, putative / cyst	1,63	1,72	3294	0,00091074	20121	0,00336368
AT5G62080	protease inhibitor/seed storage/lipid transf	0,95	3,48	3341	0,00092109	17709	0,00268489
AT1G72290	trypsin and protease inhibitor family protei	3,91	0,98	3375	0,00092713	18436	0,00286029
AT1G07190	FUNCTIONS IN: molecular_function unknow	3,09	1,08	3432	0,00094141	19279	0,00307957
AT2G21430	cysteine proteinase A494, putative / thiol p	1,84	1,42	3560	0,00096111	19993	0,003321
AT1G62170	serpin family protein / serine protease inhi	3,61	0,98	3590	0,000965	18331	0,00283111
AT3G12700	aspartyl protease family protein	2,14	1,26	3604	0,0009681	19847	0,00326974
AT2G14540	serpin family protein / serine protease inhi	0,86	3,39	3663	0,00097807	16641	0,00246234
AT2G07190	LOCATED IN: cellular_component unknow	1,98	1,30	3696	0,00098293	19852	0,00327087
AT3G15580	APG8H (AUTOPHAGY 8H); APG8 activating	1,66	1,48	3732	0,00099156	19876	0,00327738
AT5G45120	aspartyl protease family protein	1,55	1,57	3748	0,00099417	19812	0,00326027
AT2G27395	pseudogene of cysteine protease-related	4,41	0,16	5234	0,001212	1993	0,00070595
AT5G40560	DegP13 (DegP protease 13); catalytic/ pro	3,66	0,34	5826	0,00127296	4572	0,00099113
AT5G38195	protease inhibitor/seed storage/lipid transf	3,29	0,09	6478	0,00135414	895	0,00046456
AT4G12920	aspartyl protease family protein	0,22	2,19	6994	0,00141672	4128	0,00094634
AT1G65240	aspartyl protease family protein	0,14	1,80	8303	0,00156456	2693	0,0007945
AT2G28030	aspartyl protease family protein	2,17	0,08	8782	0,00161425	762	0,00043427
AT1G35625	[AT1G35625, peptidase/ protein binding /	1,98	0,30	9265	0,00165383	3762	0,00090197
AT3G22620	protease inhibitor/seed storage/lipid transf	0,27	1,13	13741	0,00209742	4246	0,00095583
AT4G22490	protease inhibitor/seed storage/lipid transf	1,23	0,32	14419	0,00218891	3375	0,00087027
AT4G22610	protease inhibitor/seed storage/lipid transf	0,07	1,07	15194	0,00229261	1066	0,00050697
AT5G56480	protease inhibitor/seed storage/lipid transf	0,21	1,06	15197	0,00229279	3094	0,00084093
AT3G07450	protease inhibitor/seed storage/lipid transf	0,03	0,95	17468	0,00263085	294	0,00031388
AT2G48130	protease inhibitor/seed storage/lipid transf	0,95	0,41	17506	0,0026351	3718	0,00089716
AT1G25510	aspartyl protease family protein	0,15	0,91	18202	0,00275346	1934	0,00070171
AT5G52160	protease inhibitor/seed storage/lipid transf	0,86	0,51	18280	0,00276677	4518	0,00098496
AT4G35880	aspartyl protease family protein	0,23	0,89	18254	0,00276754	2736	0,00079446
AT3G05790	LON4 (LON PROTEASE 4); ATP binding / A	0,87	0,30	18723	0,00284365	2375	0,00075852
AT5G36260	aspartyl protease family protein	0,81	0,47	19028	0,00290138	3715	0,00089606
AT4G12530	protease inhibitor/seed storage/lipid transf	0,08	0,82	19894	0,00310855	890	0,00046518
AT1G47710	serpin, putative / serine protease inhibitor,	0,46	0,73	20000	0,00314105	4008	0,00093617
AT5G64080	protease inhibitor/seed storage/lipid transf	0,52	0,68	20206	0,00319026	4061	0,00094163
AT3G61820	aspartyl protease family protein	0,36	0,74	20249	0,00320112	3055	0,0008362
AT3G43720	protease inhibitor/seed storage/lipid transf	0,44	0,71	20250	0,00320137	3689	0,00089438
AT1G36150	protease inhibitor/seed storage/lipid transf	0,25	0,74	20567	0,00328305	2143	0,00072057
AT3G54400	aspartyl protease family protein	0,51	0,61	20771	0,003343	3252	0,00085472
AT3G50050	aspartyl protease family protein	0,28	0,68	21167	0,0034582	1922	0,00070053
AT1G79560	FTSH12 (FTSH PROTEASE 12); ATP-depend	0,40	0,62	21246	0,00348802	2394	0,00076176
AT1G62290	aspartyl protease family protein	0,23	0,65	21487	0,0035825	1489	0,00061159
AT1G01300	aspartyl protease family protein	0,41	0,54	21627	0,00362965	1866	0,00069708
AT4G12470	protease inhibitor/seed storage/lipid transf	0,44	0,50	21643	0,00363583	1811	0,00069103
AT4G30040	aspartyl protease family	0,21	0,55	22047	0,00382818	1004	0,00048816
AT1G63280	serpin-related / serine protease inhibitor-r	0,40	0,24	22200	0,00390265	735	0,0004203
AT2G35570	pseudogene, serpin (serine protease inhi	0,07	0,55	22228	0,00391846	347	0,00033522
AT2G35570	pseudogene, serpin (serine protease inhi	0,07	0,55	22228	0,00391846	347	0,00033522
AT5G19740	[AT5G19740, peptidase M28 family protein	0,11	0,41	22521	0,00407978	336	0,00032711
AT3G16550	DEGP12 (DEGP PROTEASE 12); catalytic/ p	0,12	0,18	22722	0,00423173	169	0,00022418
AT1G64020	serpin-related / serine protease inhibitor-r	0,04	0,26	22737	0,00424277	73	0,00014165

■ FDR Up<0,0001 ■ FDR Up<0,001 ■ FDR Down<0,001

RESUME

Les plantes sont des organismes statiques et tributaires des ressources minérales présentes dans leur rhizosphère. La remobilisation des nutriments est un processus qui permet une économie nutritionnelle et un recyclage de macro- et micro - nutriments qui sont le plus souvent limitants. Le rôle du démantèlement des chloroplastes au cours de ce processus est très important pour le recyclage de l'azote, puisque ceux-ci contiennent la majeure partie des protéines foliaires. Bien que les protéines chloroplastiques soient une source essentielle pour le recyclage de l'azote foliaire, leur mécanisme de dégradation est mal connu. L'autophagie, a été proposée comme mécanisme participant au recyclage des nutriments, notamment en situation de carence ou de limitation en azote. L'autophagie, processus cellulaire de dégradation, représente un mécanisme de survie et d'adaptation, par le recyclage et l'élimination des protéines et organelles altérés.

La détermination des flux d'azote, entre la rosette et les graines par l'utilisation du marquage à l'isotope stable ^{15}N chez des mutants d'autophagie, nous a permis de montrer que l'autophagie est nécessaire à la remobilisation de l'azote. L'analyse fonctionnelle des mutants d'autophagie a permis de mettre en évidence de profondes perturbations métaboliques résultant dans l'élévation du rapport C/N. Les modifications métaboliques observées montre que les mutants d'autophagie ne présentent pas les signatures métaboliques habituellement retrouvées chez les plantes adaptées à la limitation en azote minéral, qu'ils accumulent au contraire les composés azotés et sont pauvres en ressources carbonées. Les investigations ont également révélé que l'autophagie est sélective envers certaines protéines. L'activité autophagique a été évaluée en fonction de différents niveaux d'expression d'*AtTOR* et à la suite de l'inhibition de son activité kinase. Ces résultats ont montré qu'*AtTOR*, senseur du statut nutritionnel, est un régulateur négatif de l'autophagie. L'autophagie est une étape clef du recyclage nutritionnel en réponse à une situation de stress telle que la limitation en azote.

ABSTRACT

Plants are static organisms dependent on minerals resources available in the rhizosphere. Nutrient recycling is a process allowing a nutritional economy and recycling of macro- and micro- nutrients, which are often limiting. The role of chloroplast dismantling during this process is very important for nitrogen recycling because chloroplasts contain the major part of foliar proteins. Albeit chloroplastic proteins are an essential source for foliar nitrogen recycling, their degradation process is not well understood. Autophagy has been proposed to participate in nutrients recycling, notably in nitrogen starvation or limitation. Autophagy, a cellular degradation process, represents a survival and an adaptation mechanism by recycling and eliminating defectives proteins and organelles.

Based on nitrogen fluxes determination between the rosette and the seeds by using ^{15}N labeling in autophagy (*atg*) mutants, the study has shown that autophagy is necessary for nitrogen remobilization. The functional analysis of *atg* mutants revealed deep metabolic perturbations resulting in elevated C/N ratio, marker of plant physiology status. The observed metabolic modifications are not the hallmarks of an adaptation to nitrogen limitation. Autophagy mutants indeed accumulate nitrogen compounds and present low carbohydrate contents. The investigations also revealed that autophagy is selective towards some proteins. Autophagic activity has been evaluated function of different *AtTOR* expression levels and following *AtTOR* activity inhibition. Results have shown that *AtTOR*, a sensor of the nutritional status, is a negative regulator of autophagy. Autophagy is a key step for nitrogen recycling in response to stress situation like nitrogen limitation.