



HAL
open science

Effets d'une carence en azote sur les modifications de la paroi lors du développement foliaire chez le colza

Cécile Jacques

► **To cite this version:**

Cécile Jacques. Effets d'une carence en azote sur les modifications de la paroi lors du développement foliaire chez le colza. Sciences du Vivant [q-bio]. 2018. dumas-02104285

HAL Id: dumas-02104285

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02104285>

Submitted on 19 Apr 2019

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

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

Année universitaire : 2017.-2018

Master Biologie, Agrosociétés

Parcours Amélioration, Production,
Valorisation du végétal

Option : Physiologie Moléculaire et
Adaptation aux Stress

Rapport de stage

- d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

Effets d'une carence en azote sur les modifications de la paroi lors du développement foliaire chez le colza.

Par : Cécile JACQUES

Soutenu à Rennes

le 28/06/2018

Devant le jury composé de :

Président : A. Grivot

Maître de stage :

Enseignant référent : F. Cabello

Autres membres du jury :

A. Bouchereau examinateur

C. Pau-Roblot encadrante

J.M Domon encadrant

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celles d'AGROCAMPUS OUEST et l'université de Rennes 1

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation

« Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France »

disponible en ligne <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>



Remerciements :

Je remercie tout d'abord mes encadrants au sein de l'équipe Biopi Pau-Roblot Corinne et Domon Jean-Marc pour leur aide tout au long de mon stage et lors de la rédaction de mon rapport. Laurent Leport pour avoir mis en place ce projet entre Biopi et l'IGEPP de Rennes.

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe pour leur accueil convivial et leur aide.

Je remercie aussi les stagiaires présents pour la bonne ambiance et la bonne entente présente dans notre bureau. Mais aussi les thésards pour leur bonne humeur.

Lexique :

A	Aviso
E	Express
N1	enrichi en azote
N0	appauvri en azote
PME	PectinMéthylEstérase
PG	Polygalacturonase
PAE	PectinAcétylEstérase
PLL	Pectin Like Lyases
XTH	Xyloglucan Endotransglucosylase/Hydrolase
XET	Xyloglucan EndoTransglycosylases
DM	Degré de Méthylation
OG	oligalacturonide
HGA	homogalacturonane
RG/II	rhamnogalacturonane I/II
XGA	xylogalacturonane
Fuc	Fucose
Rha	Rhamnose
Ara	Arabinose
Gal	Galactose
Gluc	Glucose
Xyl	Xylose
Gal.A	Acide Galacturonique
Glc.A	Acide Glucuronique
NRE	capacité de remobilisation de l'azote
NUE	capacité d'utilisation de l'azote
Wc	teneur en eau
RWC	taux relatif en eau

Table des figures

Figure-1. Evolution des composantes hydriques au cours du développement. Temps de relaxation calculé par signal CPMG pour une jeune feuille (A) et une vieille feuille (F) chez le colza (Musse <i>et al.</i> , 2013 ; modifiée)	3
Figure-2. Principaux polysaccharides de la paroi (Höfte et Voxeur, 2017).....	3
Figure-3. Action des polygalacturonases (PG) et pectinméthylestérases (PME) sur les pectines. HG : homogalacturonanes, RG-I et II : ramnogalacturonanes I et II (Daher <i>et al.</i> , 2015).....	4
Figure-4. Localisation des différents rang foliaires (R1 et R15 ; A) et temps de relaxation selon le rang foliaire (B). Le rang 0 correspond au « split », les valeurs négatives aux jeunes feuilles et les valeurs positives aux feuilles plus âgées, ordre des rangs sur plant Aviso. Flèches : rangs étudiés.....	5
Figure-5. Activité des enzymes de modification de la paroi (PG, A ; PME,B) et degré de méthylation (C) en condition enrichie en azote (N1). Génotype Aviso (A) et Express (E) ; rang foliaire (R1 à R15) ; activité des polygalacturonases (PG) et pectinméthylestérases (PME) et degré de méthylation (DM). Effet obtenus par tests Anova : *** hautement significatif, ** très significatif, * significatif, . non significatif.....	12
Figure-6. Teneur en oses pariétaux selon le génotype (A, E) et le rang foliaire (R) en condition enrichie en azote (N1). Génotype Aviso (A) et Express (E) ; rang foliaire (R1 à R15) ; Fuc, Fucose, Rha, Ramnose, Ara, Arabinose, Gal, Galactose, Glu, Glucose, Xyl, Xylose, Gal.A Acide Galaturonique, Glc.A, Acide glucuronique.....	12
Figure-7. Teneur en oses pariétaux présentant une variation significative selon le génotype (A, E) et le rang foliaire (R) en condition enrichie en azote (N1). Génotype Aviso (A) et Express (E) ; rang foliaire (R1 à R15) ; Fuc, Fucose (A), Xyl, Xylose (B), Glc.A, Acide glucuronique (C), Gal, Galactose (D), Rha, Ramnose (F). Effet obtenus par tests Anova : *** hautement significatif, ** très significatif, * significatif, . non significatif.....	13
Figure-8. Activité des enzymes de modification de la paroi (PG,A ; PME,B) et degré de méthylation (C) en condition appauvrie en azote (N0). Génotype Aviso (A) et Express (E) ; rang foliaire (R1 à R15) ; activité des polygalacturonases (PG) et pectinméthylestérases (PME) le degré de méthylation (DM). Effet obtenus par tests Anova : *** hautement significatif, ** très significatif, * significatif, . non significatif.....	14
Figure-9. Teneur en oses pariétaux selon le génotype (A, E) et le rang foliaire (R) en condition appauvrie en azote (N0). Génotype Aviso (A) et Express (E) ; rang foliaire (R1 à R15) ; Fuc, Fucose, Rha, Ramnose, Ara, Arabinose, Gal, Galactose, Glu, Glucose, Xyl, Xylose, Gal.A Acide Galaturonique, Glc.A, Acide glucuronique.....	14
Figure-10. Teneur en oses pariétaux présentant une variation significative selon le génotype (A, E) et le rang foliaire (R) en condition appauvrie en azote (N0). Génotype Aviso (A) et Express (E) ; rang foliaire (R1 à R15) ; Fuc, Fucose (A), Xyl, Xylose (B), Glc.A, Acide glucuronique (C), Glu, Glucose (D), Ara, Arabinose (E), Gal, Galactose (F), Rha, Ramnose (G). Effet obtenus par tests Anova : *** hautement significatif, ** très significatif, * significatif, . non significatif.....	15
Figure-11. Comparaison des activités enzymatique (PG, PME) selon le génotype (A,E) et le traitement azoté (N1, N0). Génotype Aviso (A) et Express (E) ; traitement enrichi (N1= ou appauvri (N0) en azote ; rang foliaire (R8, R10, R15) ; activité des polygalacturonases (PG, D) et pectinméthylestérases (PME, A,B,C).....	16
Figure-12. Comparaison de la teneur en oses pariétaux selon le génotype (A, E) et le traitement azoté (N1, N0). Génotype Aviso (A) et Express (E) ; traitement enrichi (N1) et appauvri (N0) en azote ; rang foliaire (R1, R3, R10, R15) ; Fuc, Fucose, Rha, Ramnose, Ara, Arabinose, Gal, Galactose, Glu, Glucose, Xyl, Xylose, Gal.A Acide Galaturonique, Glc.A, Acide glucuronique...17	17
Figure-13. Teneur en oses pariétaux selon le traitement azoté (N1, N0) pour le génotype Aviso (A). Traitement enrichi (N1) et appauvri (N0) en azote ; rang foliaire (R1 à R15) ; Fuc, Fucose, Rha, Ramnose, Ara, Arabinose, Gal, Galactose, Glu, Glucose, Xyl, Xylose, Gal.A Acide Galaturonique, Glc.A, Acide glucuronique.....	17
Figure-14. Teneur en oses pariétaux selon le traitement azoté (N1, N0) pour le génotype Express (E). Traitement enrichi (N1) et appauvri (N0) en azote ; rang foliaire (R1 à R15) ; Fuc, Fucose, Rha, Ramnose, Ara, Arabinose, Gal, Galactose, Glu, Glucose, Xyl, Xylose, Gal.A Acide Galaturonique, Glc.A, Acide glucuronique.....	17

Table des Tableaux

Tableau-I. Relation entre l'activité des pectinméthylestérases (PME) et polygalacturonases (PG) en condition enrichie en azote. Coefficient de corrélation entre activité des PGs et PMEs.....	12
Tableau-II. Relation entre les pourcentages en oses pariétaux en condition enrichie en azote. Coefficient de corrélation entres les oses pariétaux.....	13
Tableau-III. Relation entre l'activité des pectinméthylestérases (PME) et polygalacturonases (PG) en condition appauvrie en azote. Coefficient de corrélation entre activité des PGs et PMEs	14
Tableau-IV. Relation entre les pourcentages en oses pariétaux en condition appauvrie en azote. Coefficient de corrélation entres les oses pariétaux.....	16

Sommaire

I- Introduction.....	1
II- Matériel et méthode	5
A) Matériel végétal	5
B) Détermination de la teneur en oses non structuraux	5
1) Extraction à l'alcool	6
2) Dosage des oses solubles (glucose, fructose, saccharose) par HPAEC-PAD	6
C) Détermination de la teneur en oses structuraux.....	6
1) Extraction des parois et élimination de l'amidon	6
2) Dosage des oses neutres et acides	7
D) Dosage de l'activité enzymatique des polygalacturonases (PGs)	8
1) Extraction enzymatique	8
2) Dosage de l'activité des PGs	8
E) Dosage des activités enzymatiques des pectineacétyl esté rases (PAEs) et pectiméthylesté rases (PMEs)	9
1) Extraction enzymatique	9
2) Dosage de l'activité des PAEs	9
3) Dosage de l'activité des PMEs.....	10
F) Analyses par FT-IR	10
G) Analyses statistiques	10
III- Résultats.....	11
A) Effet du développement foliaire et du génotype sur les modifications de la paroi en condition enrichie en azote.....	11
1) Activité des enzymes de modification de la paroi	12
2) Composition en oses neutres et acides de la paroi	12
B) Effet du développement foliaire et du génotype sur les modifications de la paroi en condition appauvrie en azote	14
1) Activité des enzymes de modification de la paroi	14
2) Composition en oses neutres et acides de la paroi	14
C) Effet du traitement azoté selon le rang et le génotype sur les activités enzymatiques et la composition de la paroi	16
1) Effet du traitement azoté et du génotype	16
2) Effet Du traitement azoté selon le génotype considéré	17
IV-Discussion	18
A) Modifications de la paroi lors du développement foliaire.....	18
B) Effet du traitement azoté sur la paroi	20
V-Conclusion et perspectives.....	21
VI-Bibliographie	22

I- Introduction

L'agriculture doit être de plus en plus performante tout en palliant les effets néfastes du changement climatique, tout cela afin de nourrir une population mondiale de plus en plus grandissante. Dans le but de mieux comprendre l'effet de l'environnement en tant que contraintes abiotiques pouvant avoir un impact sur les rendements, des études sont effectuées sur différentes plantes modèles mais aussi des plantes d'intérêt agronomique tel que le colza (*Brassica napus*). L'étude du colza est importante car il représente la troisième plus grande culture mondiale d'oléagineux. Celui-ci est cultivé dans plusieurs objectifs : la production d'huile pour l'alimentation humaine, différentes utilisations non alimentaires tel que la fabrication de biofioul, de détergeant ou de lubrifiant, mais aussi pour l'alimentation animal celui-ci étant riche en protéine et en micronutriment (Poret *et al.*, 2016). Dans un contexte agronomique demandant une production de plus en plus importante l'utilisation d'intrant est devenue le mode de fertilisation principale. Un des éléments importants nécessaire au développement et à la croissance des plantes est l'azote, qui est fourni à la plante en grande quantité. Les formes de fertilisation azotée les plus utilisées sont le nitrate et l'ammonium, cependant ces deux éléments sont très mobiles dans le sol, seul 30 à 40 % de ce qui est répandu dans les cultures est utilisé par les plantes (Kant *et al.*, 2010). L'assimilation du nitrate permet à la plante un développement optimum en formant des réserves et en utilisant celui-ci dans son métabolisme (Andrews *et al.*, 2014). Par l'importance de cet élément, sa faible disponibilité dans le sol peut avoir un impact important sur le développement de la plante. De plus, le colza (*B. napus*) présente une faible capacité de remobilisation de l'azote (NRE), c'est à dire une faible capacité à transporter celui-ci vers les organes puits et donc une faible capacité d'utilisation de cet élément (NUE). Cela implique une fertilisation importante pour assurer de bons rendements (Sorin *et al.*, 2016). Malgré cela les feuilles tombent avec un fort taux d'azote non remobilisé représentant 2,5 à 3 % [w/w] de la biomasse sèche (Musse *et al.*, 2013). Cette sur-fertilisation a alors à la fois un impact environnemental et économique (Sorin *et al.*, 2015). Il a été montré que ce faible NRE ne viens pas d'une limitation des transports d'acide aminés dans le phloème mais plus d'une hydrolyse incomplète des protéines lié aux protéases (Sorin *et al.*, 2016). De plus, en cas de déficience modérée en azote, que le génotype soit adapté (Aviso) ou non (Express) à cette déficience, il a été constaté une diminution du nombre de rang foliaire, une diminution du rendement jusqu'à 30%, une augmentation de l'espace intracellulaire dû à une perte de l'adhésion cellulaire et aussi une action sur la synthèse de protéine (Sorin *et al.*, 2016). La déficience en azote semble aussi induire une accélération de la sénescence chez certain génotype.

La chute des feuilles est due à la sénescence des tissus (au cours de cette étude seule la sénescence séquentielle sera considérée). La sénescence est un processus se déroulant avec une haute régulation du métabolisme de la plante entière et pouvant être induite par le développement ou par un stress (Musse *et al.*, 2013). Ce mécanisme permet, grâce à trois phases, la remobilisation plus ou moins efficace du carbone et de l'azote selon la plante considérée. La première phase est régulée par les hormones et correspond à la mise en place du signal de la sénescence induisant l'action de gènes clefs. Ensuite les tissus entrent dans une phase dégénérative où la dégradation et la remobilisation se mettent en place. La dernière étape correspond à la dégradation du noyau, des tonoplastes et la rupture de la paroi (Sorin *et al.*, 2015). Une mise en place lente de la sénescence chez la plante permet d'assurer une meilleure remobilisation (Roger *et al.*, 2016). De précédentes études ont permis de caractériser certains traits physiologiques liés à la sénescence chez le colza. Tout d'abord une chute de la teneur en chlorophylle est observée chez les vieilles feuilles, tout comme celle de la teneur en amidon. De plus une diminution de la biomasse sèche est observée alors que la teneur en eau (Wc) augmente tout au long du vieillissement de la feuille, ce qui met en évidence un processus associé à l'hydratation (Musse *et al.*, 2013). Cette variation du Wc n'est cependant pas liée à un stress hydrique puisque le taux relatif en eau (RWC) reste inchangé. Cela implique donc une augmentation de l'élasticité de la paroi au cours du développement (Musse *et al.*, 2013). Ces différentes caractéristiques ne permettent cependant pas d'étudier rigoureusement la sénescence entre plantes sous différentes conditions. En effet pour un même rang foliaire des différences physiologiques peuvent être présentes chez différentes plantes. (Sorin *et al.*, 2015).

Des analyses de microscopie optique réalisées par Musse *et al.* (2013) ont permis de mettre en avant des changements structuraux dus à la sénescence. Ces analyses montrent une structure moins organisée chez les feuilles sénescentes par rapport aux jeunes feuilles, et mettent en avant que l'augmentation de l'épaisseur est principalement due à l'élargissement des cellules du parenchyme palissadique, le parenchyme lacuneux ne montrant pas la même tendance. La différence observée entre les deux types de parenchymes pourrait venir du fait que le parenchyme palissadique a un rôle plus important dans la photosynthèse alors que le parenchyme lacuneux présente plus un rôle dans l'homéostasie, ce qui peut expliquer un impact plus important de la sénescence sur le parenchyme palissadique (Sorin *et al.*, 2015). De plus, les chloroplastes, source principale d'azote remobilisable, sont dégradés au cours de la sénescence. Des analyses de relaxométrie RMN ont aussi été réalisées afin de caractériser les changements structuraux. Cette technique est sensible aux faibles variations en teneur en eau mais aussi au processus d'échange de particules entre différents compartiments cellulaires.

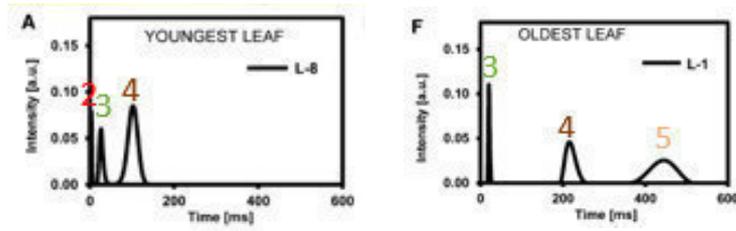


Figure-1. Evolution des composantes hydriques au cours du développement. Temps de relaxation calculé par signal CPMG pour une jeune feuille (A) et une vieille feuille (F) chez le colza (*Musse et al.*, 2013 ; modifiée).

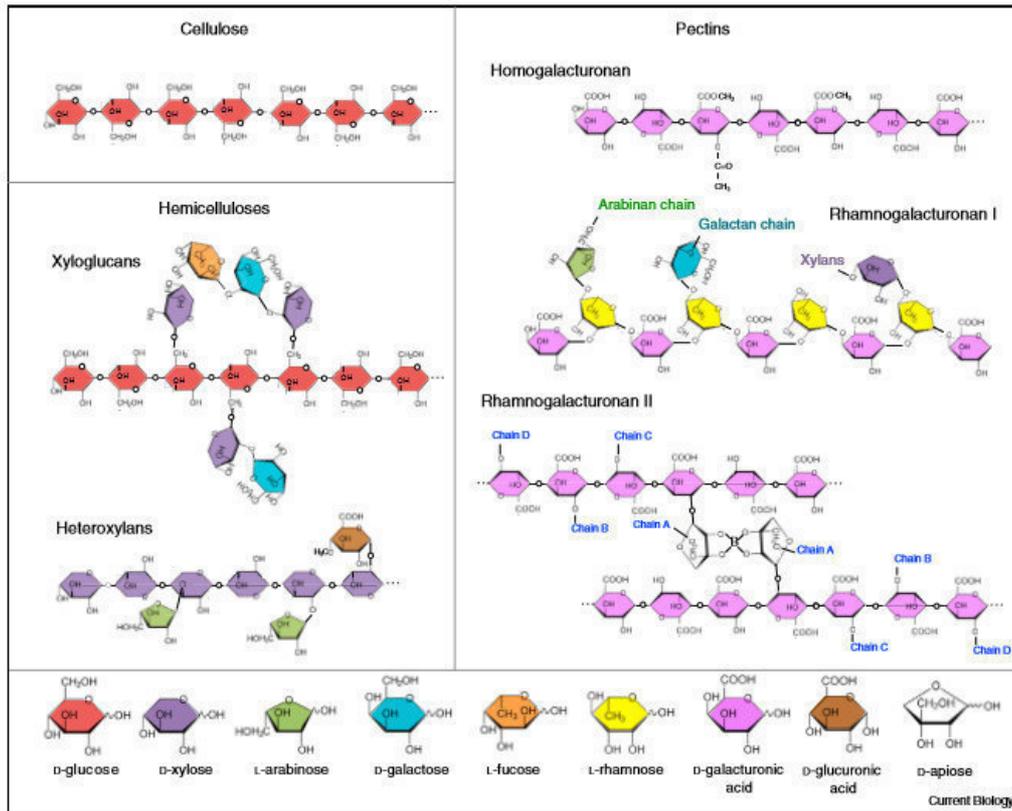


Figure-2. Principaux polysaccharides de la paroi (Höfte et Voxeur, 2017).

Ainsi une mesure de temps de relaxation T2 permet d'observer l'évolution structural selon les conditions étudiées (Musse *et al.*, 2013). Chez les jeunes feuilles, quatre signaux RMN avec un T2 différent ont été observés, ceux-ci correspondant à 4 types de composantes. La première composante correspond à une fraction solide et les 3 autres (2, 3, 4) à des fractions liquides de la cellule (Fig-1.A). La deuxième composante est l'eau apoplastique et celle contenu dans l'amidon. La troisième composante correspond à l'eau chloroplastique. La quatrième composante correspond à l'eau vacuolaire et celle-ci après un certain stade, se sépare en deux composantes différentes 4 et 5 (Fig-1.F), ce phénomène est nommé « split ». L'apparition de cette cinquième composante peut être liée à la différence de comportement entre le parenchyme palissadique et le parenchyme lacuneux. En effet la composante 5 présente une augmentation plus importante de son T2 ce qui peut être dû à un influx d'eau et donc un élargissement des cellules et une diminution de la biomasse sèche entrainant la dilution des solutés. La composante 4 correspondrait alors à l'eau vacuolaire du parenchyme lacuneux alors que la composante 5 à celle du parenchyme palissadique (Sorin *et al.*, 2015). Afin d'optimiser l'étude de la sénescence chez les rangs foliaire, le « split » permettra de définir un état commun à toutes les plantes et génotypes que l'on utilisera ensuite. Ces phénomènes d'élargissement et d'hydratation pourraient être expliqués par la dégradation de macromolécules (Musse *et al.*, 2013) ou de la paroi cellulaire. C'est cette dernière qui fait l'objet de cette étude.

La paroi secondaire des dicotylédones est composée de cellulose entourée par une matrice de polysaccharide pectique (Sénéchal *et al.*, 2015). Les pectines y ont un rôle structural important. Ce composé de type « glucidique » possède quatre types de domaine qui sont les domaines homogalacturonane (HGA), rhamnogalacturonane I et II (RGI et II) et xylogalacturonane (XGA), le domaine HGA étant le majoritaire (65 % de la pectine) (Pelloux *et al.*, 2007 ; L'enfant *et al.*, 2015). Ces différents domaines possèdent des compositions en oses spécifiques qui peuvent être modifiées pendant le développement ou sous certaines contraintes. Le domaine HGA est constitué d'une alternance d'acide galacturonique (Gal.A) (Fig-2). Alors que le domaine RGI est constitué de chaîne alternant rhamnose (Rha), acide galacturonique et possédant des ramifications composées principalement des groupements galactane et arabinane. Le domaine RGII est composé de rhamnogalacturonan contenant différents résidus osidiques. Le domaine XGA est constitué d'une chaîne d'acide galacturonique et possède des branchements xylose (Vorwerk *et al.*, 2004)

Au cours du développement ou en réponse à des stress, des changements majeurs de la paroi sont mis en place grâce à des enzymes de remodelage des homogalacturonanes (HGMEs) permettant d'agir sur la porosité, le taux d'hydratation mais aussi l'adhésion cellulaire

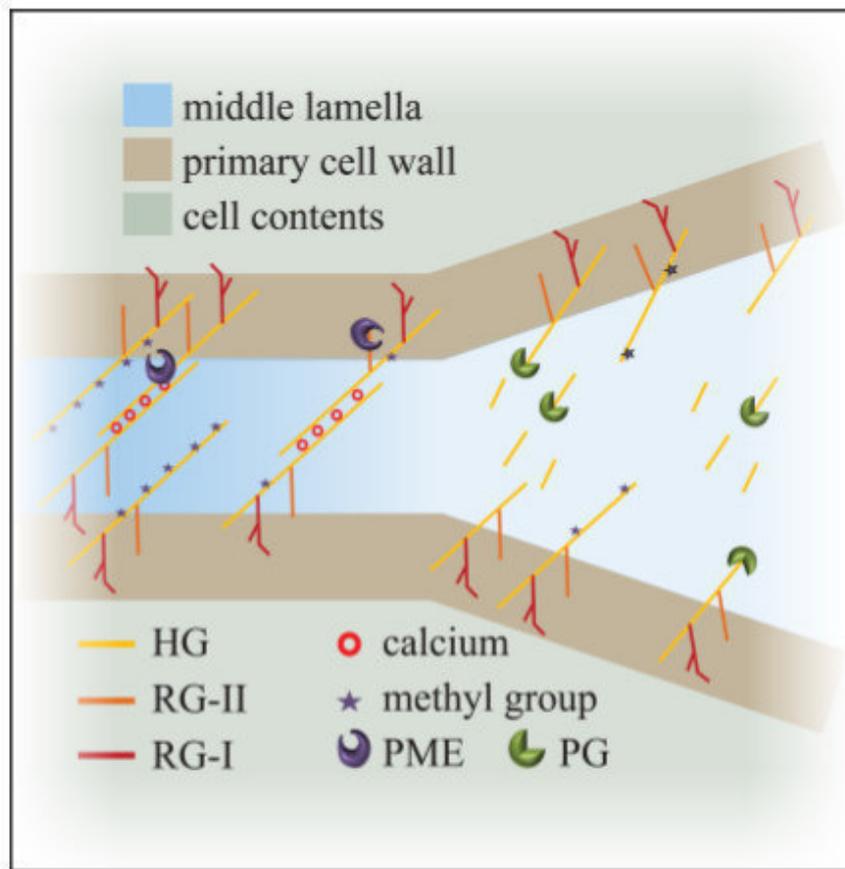


Figure-3. Action des polygalacturonases (PG) et pectinméthylestérases (PME) sur les pectines. HG : homogalacturonanes, RG-I et II : ramnogalacturonanes I et II (Daher *et al.*, 2015).

(Pelloux *et al.*, 2007 ; Sénéchal *et al.*, 2014). Ces différentes enzymes sont les pectinéméthylestérases (PME), les pectinacétylestérases (PAE) et les polygalacturonases (PG) et pectin like lyases (PLL). Les PMEs agissent sur le degré de méthylation (DM) des pectines en catalysant l'hydrolyse du méthylester en C6 des résidu Gal.A ce qui induit la formation de groupe carboxyle libre, de méthanol et une acidification de la paroi (Fig-3) (Sénéchal *et al.*, 2014). Cette déméthylation de la pectine permet soit la formation d'un gel par la formation d'« egg-box », soit l'action d'autres enzymes de modification des pectines comme les PGs (Pelloux *et al.*, 2007). Les PAEs peuvent dans un même temps hydrolyser les groupements O-acétylés des pectines et ainsi permettre l'action d'autres HGMEs (Sénéchal *et al.*, 2014). Une action synergique des PMEs et PAEs permet alors de médier la formation d'« eggbox » ou la dégradation des HGAs par les PGs et PLLs (Sénéchal *et al.*, 2014). Les PGs et PLLs vont alors dégrader les pectines en ciblant les zones partiellement déméthylées (Sénéchal *et al.*, 2014), les PGs hydrolysant de manière aléatoire ou en position terminal les HGAs ce qui induit la formation d'oligogalacturonides (OG) et le relachement de la paroi (Hocq *et al.*, 2017). L'activité de certaines PMEs est régulée par le pH de la paroi mais aussi par les pectinmethylésterase inhibitor (PMEI) inhibant l'action de ces enzymes. Les pH optimaux des PMEs de plante étant majoritairement neutre à basique, différents pools de PMEs sont alors recrutés selon le pH du microenvironnement et du degré de méthylation des pectines (Sénéchal *et al.*, 2014). Les pH optimaux des PAEs de plante sont aussi majoritairement neutre à basique et celles-ci ont une activité qui augmente quand le substrat a été déméthylé au préalable (Sénéchal *et al.*, 2014). A l'inverse, les PGs de plante possèdent des pH optimaux plutôt acides et sont inhibées par des PGIPs se fixant sur celles-ci (Sénéchal *et al.*, 2014). Ainsi des pools d'enzymes spécifiques sont recrutés selon l'environnement et le stade de développement (Louvet *et al.*, 2011) et l'action de ces différentes enzymes va avoir un rôle dans le développement. Par exemple chez *Arabidopsis thaliana* différents gènes codant des PMEs, PMEIs, PGs et PLLs sont soit sur ou sous régulés pendant la croissance de l'hypocotyle (Sénéchal *et al.*, 2014). De plus des stress vont induire ou inhiber l'expression de ces enzymes, les métaux lourds inhibant les PGs et induisant les PMEs et PAEs par exemple (Le Gall *et al.*, 2015).

Dans ce contexte, le stage a été effectué dans le cadre des recherches menées par l'équipe RCA de l'IGEPP (INRA de Rennes), étudiant l'effet du développement foliaire et de la nutrition azotée sur de développement du colza, en partenariat avec l'équipe BIOPI d'Amiens. L'équipe BIOPI étudie les modifications biochimiques et moléculaires de la paroi au cours du développement végétale. Ce partenariat a pour but de savoir si les modifications structurales déjà observée au niveau du parenchyme palissadique (Musse *et al.*, 2013) sont liées à des modifications de la paroi. Ce stage a pour objectifs d'étudier les modifications ayant lieu au

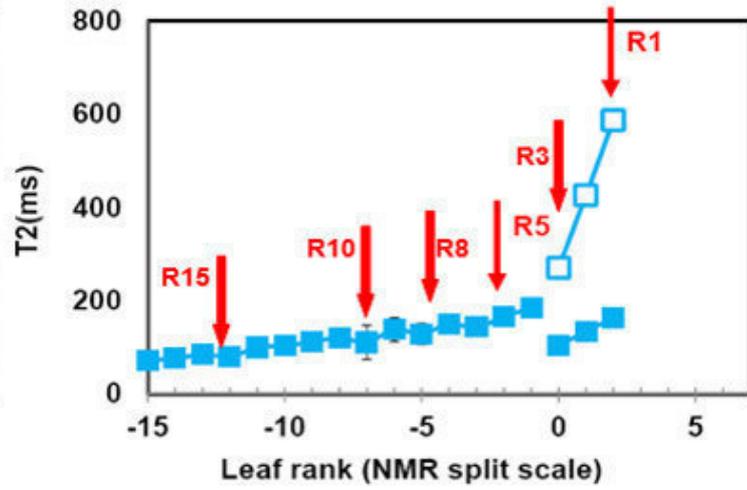
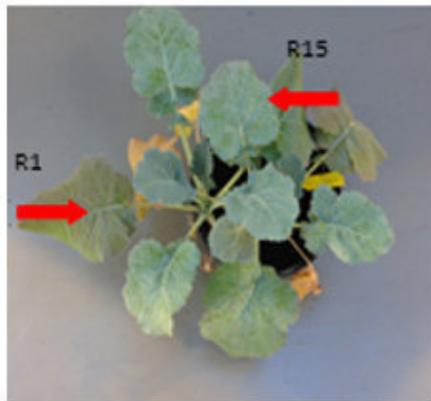


Figure-4. Localisation des différents rang foliaires (R1 et R15 ; A) et temps de relaxation selon le rang foliaire (B). Le rang 0 correspond au « split », les valeurs négatives aux jeunes feuilles et les valeurs positives aux feuilles plus âgées, ordre des rangs sur plant Aviso. Flèches : rangs étudiés.

niveau de la paroi au cours du développement foliaire et de voir l'impact que la nutrition azotée peut avoir chez deux géotypes de colza (Aviso, Express). Pour cela des mesures ont été effectuées sur différents rangs foliaires de ces géotypes en condition de fertilisation enrichie et appauvri en azote. Tout d'abord des mesures d'activité d'enzymes de modification de la paroi ont été effectuées (PG, PME et PAE), celles-ci ont ensuite pu être complétées par des mesures du degré de méthylation des pectines. Ensuite des dosages d'oses structuraux et non structuraux ont été réalisés afin de mettre en avant les changements de composition de la paroi mais aussi du contenu en oses des différents échantillons.

II- Matériel et méthode

A) Matériel végétal

Le matériel végétal est composé de plants de colza (*Brassica napus*) cultivés au champ à Rennes selon deux conditions : une condition enrichie en azote (N1) et une condition appauvrie en azote (N0). Les plants correspondent à deux géotypes, Aviso (A) adapté à la déficience en azote et Express (E) sensible au stress azoté. Pour chaque condition et géotype quatre répétitions ont été effectuées sous la forme de quatre blocs au champ, seuls les blocs 1, 3 et 4 (X1, X3, X4; X: A ou E) ont été conservés car ils étaient les plus homogènes. Les différentes mesures ont été effectuées sur 2 blocs pour chaque condition et chaque géotype, chaque répétition représentant une plante. Après 6 mois de culture des disques ont été prélevés de part et d'autre de la nervure central pour chaque rang foliaire. La numérotation des rangs commence au rang le plus âgé (R1) jusqu'au rang le plus jeune (R15). Des analyses RMN ont alors permis de détecter le rang foliaire où se déroule le « SPLIT » afin de pouvoir analyser les rangs à un même stade physiologique selon la méthode de Musse *et al.* (2017). Ces analyses ont permis de détecter l'existence du « SPLIT » pour le rang 1 quel que soit la condition (Fig-4.B). L'apparition de celui-ci variant selon les conditions, le géotype et le bloc étudié. Les autres rangs étudiés sont les rangs 3, 5, 8, 10 et 15, afin de mesurer les modifications ayant lieu tout au long du développement (Fig-4.A).

B) Détermination de la teneur en oses non structuraux

Un dosage des oses non structuraux a été réalisé selon la méthode décrite par Souza *et al.*, (2013).

1) Extraction à l'alcool

Afin d'extraire les oses non structuraux, des extraits d'environ 50 mg de matière fraîche ont été utilisés. Trois lavages successifs ont été réalisés avec 1.5 mL d'éthanol (80%) à 80°C pendant 20 min. Après chaque lavage les échantillons ont été centrifugés (10500 rpm, 10 min) à température ambiante, puis les surnageants ont été récupérés et regroupés dans un tube de 15 mL pour chaque échantillon. Les surnageants ont ensuite été évaporés (speedvac) pendant 6 heures. Ces échantillons contiennent alors les oses solubles. Le culot obtenu après les trois lavages contient lui l'amidon, et a été lavé une fois avec 1 mL d'eau Milli-Q avant d'être centrifugé (10500 rpm, 10 min) à température ambiante et le surnageant a été éliminé. Les culots ont alors été congelés (-80°C) et lyophilisés toute la nuit.

2) Dosage des oses solubles (glucose, fructose, saccharose) par HPAEC-PAD

Après évaporation de l'éthanol, l'extrait a été repris dans 1 mL d'eau Milli-Q avant d'être filtré sur un filtre Amicon Ultra 3K (0.5 mL). Le filtrat a ensuite été dilué au vingtième. Puis une analyse par chromatographie liquide haute performance échangeuse d'anion couplé avec un détecteur par ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD) est réalisée. La séparation glucose, fructose et saccharose a été réalisée grâce à un gradient avec une solution tampon de NaOH (200mM, A) et de l'eau ultra pure (B) dans une colonne CarboPac PA-1 (ID 4 mm x 250 mm) précédée d'une pré-colonne CarboPac PA1 (ID 4 mm x 50 mm). Le débit a été fixé à 1 mL/min, la température de la colonne était de 30° C et le volume d'injection était de 25 µL. Finalement, le gradient d'élution était le suivant : 0–25 min 50% A and 50% B, 25–26 min 50–100% A et 50%-0% B, 26–35 min 100% A, 35-36min 100%-50% A et 0%-50% B, 36–50 min 50% A and 50% B

C) Détermination de la teneur en oses structuraux

1) Extraction des parois et élimination de l'amidon

Afin d'extraire les parois des échantillons, la méthode décrite par Carpita et *al.*, (2001) a été utilisée à partir de 100 mg de matière fraîche. Tout d'abord, les échantillons ont été lavés trois fois avec 1.6 mL d'éthanol absolu pendant 15 min à 70°C puis centrifugés (1000 rpm, 5 min) à température ambiante, le surnageant est alors éliminé. Le culot est repris dans 1.8 mL de tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7.2) SDS 1% (p/v) puis incubé pendant 30 min à 70 °C, avant d'être centrifugé (10000 rpm, 5 min) à température ambiante pour conserver le culot. Celui-ci a alors été lavé à l'eau Milli-Q (1 mL), à l'éthanol 70% (1 mL) et à l'eau Milli-Q (1 mL), puis congelé (-20°C) et lyophilisé tout une nuit.

L'amidon a ensuite été éliminé afin d'éviter un bruit de fond du glucose trop important. Pour cela les échantillons ont été traités avec de l' α -amylase selon la méthode décrite par Fleischer et *al.*, (1999). Les échantillons de paroi lyophilisée ont ensuite été homogénéisés dans un tampon Na_2HPO_4 (100 mM, pH6,8) dans un ratio de 50 μL pour 1 mg de matière sèche. La digestion a été réalisée grâce à deux ajout d'1 μL d' α -amylase (0.5 U/ μL) pour 1 mg de matière sèche, le deuxième 8 heures après le premier laissé pendant une nuit. Puis l'échantillon a été centrifugé (10000 rpm, 5mn) à température ambiante. Le culot est alors conservé et lavé à l'eau Milli-Q (1 mL), puis à l'éthanol 70% (1 mL) et enfin à l'eau Milli-Q (1 mL). Les échantillons ont ensuite été congelés (-20°C) puis lyophilisés pendant une nuit ce qui constituera notre échantillon de parois cellulaires.

2) Dosage des oses neutres et acides

Les échantillons de paroi extrait ont alors subi une hydrolyse acide en plaçant 1 mg d'échantillon dans un tube en verre (13 mm de diamètre) au quel est ajouté 1 mL de solution d'acide trifluoroacétique 4N (TFA, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$) avant de les incubés pendant 4 H à 100 °C. Après l'hydrolyse le TFA a été évaporé sous flux de N_2 gazeux.

Les parois ont ensuite été reprises dans 1 mL d'eau Milli-Q puis filtrées à l'aide de seringue et de filtre seringue Millex Milipore pores 0.22 μm , diamètre 13 mm. Les oses neutres et oses acides ont été analysés par HPAEC-PAD (Dionex-ICS3000, Dionex, CA, USA). Le débit a été fixé à 1 mL/min, la température de la colonne était de 30 °C et le volume d'injection était de 25 μL . Pour la séparation des oses neutres (arabinose, fucose, galactose, glucose, rhamnose, xylose), les phases mobiles étaient eau ultra pure (A), NaOH 160 mM (B) et NaOH 200 mM (C). Le gradient d'élution étaient les suivants : 0-25 min 90% A et 10% B, 25-26 min 0-100% C, 26-35 min 100% C, 25-36 min 100-0% C, 36-50 min 90% A et 10% B. Tandis que pour la séparation des oses acides (acide galacturonique, acide glucoronique), les phases mobiles étaient NaOH 0,16 M (A) et NaOAc 0,6 M dans NaOH 0,16 M (B). Les profils d'élution étaient les suivants : 0-5 min 100% A, 5-35 min 0-100% B, 35-40 min 100% B, 40-42 min 100-0% B, 42-50 min 100 % A.

D) Dosage de l'activité enzymatique des polygalacturonases (PGs)

1) Extraction enzymatique

L'extraction est réalisée à partir de 50 mg d'échantillon de matériel frais broyé conservé à -80 °C. Pour cela 200 µL de tampon sodium acétate (50 mM, pH 5) + LiCl (1 M) a été ajouté aux échantillons, puis les échantillons ont été incubés sous agitation (65 rpm, 30 min) à 4 °C. Ensuite les échantillons ont été centrifugés (13000 rpm, 10 min) à 10 °C puis les surnageant récupérés. Cette étape a été réalisée une seconde fois. Afin de concentrer les protéines un dessalage a été réalisé à l'aide de tube Millipore avec filtre à 10 kDa qui ont été équilibrés avec 400 µL de tampon sodium acétate (50mM, pH 5). Dans un second temps l'extrait a été ajouté dans les colonnes, puis centrifugé (10 000 rpm, 5 min) à 4 °C. La colonne a été rincée 3 fois avec 200, 200 et 400 µL de tampon sodium acétate. Les échantillons ont été centrifugés (10 000 rpm, 5 min) à 4 °C après chaque rinçage. Afin de récupérer l'extrait la colonne a été retournée dans un nouveau tube et éluée en centrifugeant (1000 rpm, 2 min) à 4 °C.

2) Dosage de l'activité des PGs

Le dosage de l'activité PG a été réalisé selon un dosage Nelson (1994) miniaturisé sur microplaque 96 puits à l'aide de réactif cuivrique et de réactif arsenomolybdate. Ce dosage permet de quantifier le taux de Gal.A libéré par l'action des PGs sur l'acide polygalacturonique (PGA, 1%). Une gamme a été réalisée avec de l'acide galacturonique (Gal-A, 5 mM), celle-ci allant de 0 à 100 nmol de Gal.A, 25 µL de PGA ont été ajoutés en même temps que pour les échantillons avec substrat. Dans chaque puits un volume correspondant à 20-30 µg de protéine a été déposé auquel a été ajouté 25 µL de PGA et qsp 50 µL de tampon sodium acétate (50 mM, pH 5). Deux puits témoins sont réalisés en remplaçant le PGA par du tampon acétate. La plaque a alors été incubée (37 °C) pendant 1 H avant que 75 µL de réactif cuivrique soit ajouté, puis incubée (80 °C) pendant 30 min. Après avoir laissé refroidir la plaque 75 µL de réactif Arsenomolybdate ont été ajoutés puis la lecture a été réalisée à 620 nm.

E) Dosage des activités enzymatiques des pectineacétylestérases (PAEs) et pectiméthylestérases (PMEs)

1) Extraction enzymatique

L'extraction est réalisée à partir de 50 mg d'échantillon de matériel frais broyé conservé à -80 °C. Pour cela 300 µL de tampon phosphate (50 mM, pH 7,5) + NaCl (2 M) a été ajouté aux échantillons, puis les échantillons ont été incubés sous agitation (65 rpm, 30 min) à 4 °C. Ensuite les échantillons ont été centrifugés (13000 rpm, 10 min) à 4 °C puis les surnageants récupérés. Cette étape a été réalisée une seconde fois. Afin de concentrer les protéines un dessalage a été réalisé à l'aide de tube Millipore avec filtre à 10 kD qui ont été équilibrés deux fois avec 400 µL de tampon Mclivaine's (50mM, pH 6) + NaCl (150 mM). Dans un second temps 300 µL d'extrait ont été ajoutés dans les colonnes une fois celles-ci équilibrées et les tubes vidés, puis centrifugés (10 000 rpm, 5 min) à 4°C, cette étape a été répétée avec le surnageant restant. Puis la colonne a été rincée 2 fois avec 300 µL de tampon Mclivaine's. Les échantillons ont été centrifugés (10 000 rpm, 5 min) à 4 °C après chaque rinçage. Afin de récupérer l'extrait la colonne a été retournée dans un nouveau tube et éluée en centrifugeant (1000 rpm, 2 min) à 4 °C.

2) Dosage de l'activité des PAEs

Le dosage de l'activité des PAEs a été réalisé sur une plaque UV 96 puits à l'aide du kit K-acet RM (megazyme). Ce dosage permet de quantifier le taux d'acide acétique libéré par l'action de PAEs. Le substrat utilisé pour ce dosage est la pectine de betterave (10 mg/mL). Une gamme a été réalisée avec de l'acide acétique du kit (100 µg/mL), celle-ci allant de 0 à 2,5 µg d'acide acétique. Les échantillons ont été traités avant le dosage avec 120 µL de substrat, ajouté à un volume correspondant à environ 20 µg de protéine et qsp 150 µL de tampon Mclivaine's (50 mM, pH 6) + NaCl (50 mM) pendant 2 h à 40 °C. Puis dans chaque puits 10 µL d'extrait traité a été déposé et un mix composé selon le kit a été ajouté. Une première lecture a été réalisée après 4 min d'incubation dans le lecteur de plaque à 340 nm puis une fois le dernier réactif du kit ajouté la plaque a été incubée 12 min dans le lecteur avant d'être lue une seconde fois.

3) Dosage de l'activité des PME

Le dosage de l'activité des PME a été réalisé sur microplaque 96 puits à l'aide d'une solution d'alcool oxydase (0,025 U/puits) et d'une solution de révélation composée de 1,54 g d'acétate ammonium, de 20 µL de 2,4-pentadione (99%) et 28 µL d'acide acétique glacial pour 10 mL de tampon phosphate (50 mM, pH 7,5). Ce dosage permet de quantifier le taux de méthanol libéré par l'action des PME sur les pectines. Le substrat utilisé pour ce dosage est la pectine de citron (DM=85%, 20 mg/mL). Une gamme a été réalisée avec du méthanol (15 mM), celle-ci allant de 0 à 150 nmol de méthanol. Des mix ont été réalisés avec l'alcool oxydase, la solution de pectine et le tampon phosphate avec respectivement 5 µL, 5µL et 80 µL pour chaque puits de la gamme et 5µL, 5 µL et 85 µL pour chaque puits contenant 5 µL d'extraits. Une fois la gamme, les extraits et les différent mix déposés la plaque a été incubée 30 min à 28 °C. Ensuite 100 µL de solution de révélation (1,54 g acétate d'amonium, 20 µL 2,4-pentadione, 28 µL acide acétique glacial, 10 mL tampon) ont été ajoutés à chaque puits avant que la plaque soit incubée 15 min à 68 °C, puis la lecture a été effectuée à 420 nm.

F) Analyses par FT-IR

Environ 1mg de parois sèches est déposé sous l'enclume du spectromètre à infrarouge « JASCO V360 ». Les spectres de 32 scans sur une largeur spectrale de 700 à 4000 nm sont réalisés. Le calcul du degré de méthylation s'effectue à l'aide des mesures des intensités corrigées des signaux caractéristiques des COO⁻ (1636 nm) et COOMe (1734 nm) des pectines (Manrique et Lajolo, 2002). Dans un premier temps un coefficient R est calculé et correspond à $R = I_c(1734 \text{ nm}) / [I_c(1734 \text{ nm}) + I_c(1636 \text{ nm})]$ (I_c , Intensité corrigée). Ensuite une gamme étalon a été réalisée grâce à différents échantillons de pectines commerciales dont on connaît le degré de méthylation. Ainsi la relation entre R et le degré de méthylation est $DM = R \times 140,64$.

G) Analyses statistiques

Une analyse de variance multifactorielle a été réalisée afin d'étudier les effets du génotype (G), de l'absence comparée à la présence de fertilisation azotée (Tr), du rang foliaire (R) ainsi que des interactions entre ces trois variables (G:Tr, G:R). Ces différences ont été recherchées pour les activités enzymatiques mesurées, ainsi que pour le degré de méthylation et les teneurs en oses pariétaux calculés. Les effets étant considérés comme significatifs à $p\text{-value} < 0.01$.

Afin de voir s'il existe un lien entre les différentes activités enzymatique et les différentes teneurs en oses pariétaux, des corrélations entre ces différentes variables ont été recherchées. Seuls les coefficients de corrélation (Pearson) supérieur à 0.5 ont été considérés comme significatifs.

Ces différents tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel R, sous l'interface Rstudio.

III- Résultats

Les plants de colza (*Brassica napus*) ont été cultivés à Rennes selon deux conditions : une condition enrichie en azote (N1) et une condition appauvrie en azote (N0). Les plants correspondent à deux génotypes, Aviso (A) adapté à la déficience en azote et Express (E) sensible au stress azoté.

Afin d'étudier l'impact du manque d'azote et du développement foliaire sur la structure de la paroi, différentes mesures ont été effectuées pour deux répétitions biologiques contenant les deux génotypes (Aviso et Express) sur 6 rangs foliaires différents. Les rangs foliaires étudiés pendant cette étude sont les rangs 1, 3, 5, 8, 10 et 15, (Fig-4.A), le rang 1 correspondant au rang le plus âgé et le rang 15 le plus jeune. En ce qui concerne les différents résultats obtenus pour les activités d'enzymes de modification de la paroi, seul les résultats obtenus pour l'activité des PAEs ne sont pas présentés car présentent une variation importante entre répétitions biologiques (Annexe I). De plus les résultats présentent les teneurs en oses pariétaux mesurés, tandis le dosage teneurs en oses solubles ont été réalisés sur un nombre plus restreint de rangs foliaires et montrent une variabilité assez importante entre les blocs (Annexe II) et ne seront donc pas analysés dans cette étude.

A) Effet du développement foliaire et du génotype sur les modifications de la paroi en condition enrichie en azote

Tout d'abord, nous avons voulu comparer les deux génotypes cultivés en conditions optimales en azote afin d'observer s'il y avait des différences au niveau de la paroi pour ces 2 génotypes et selon le rang foliaire.

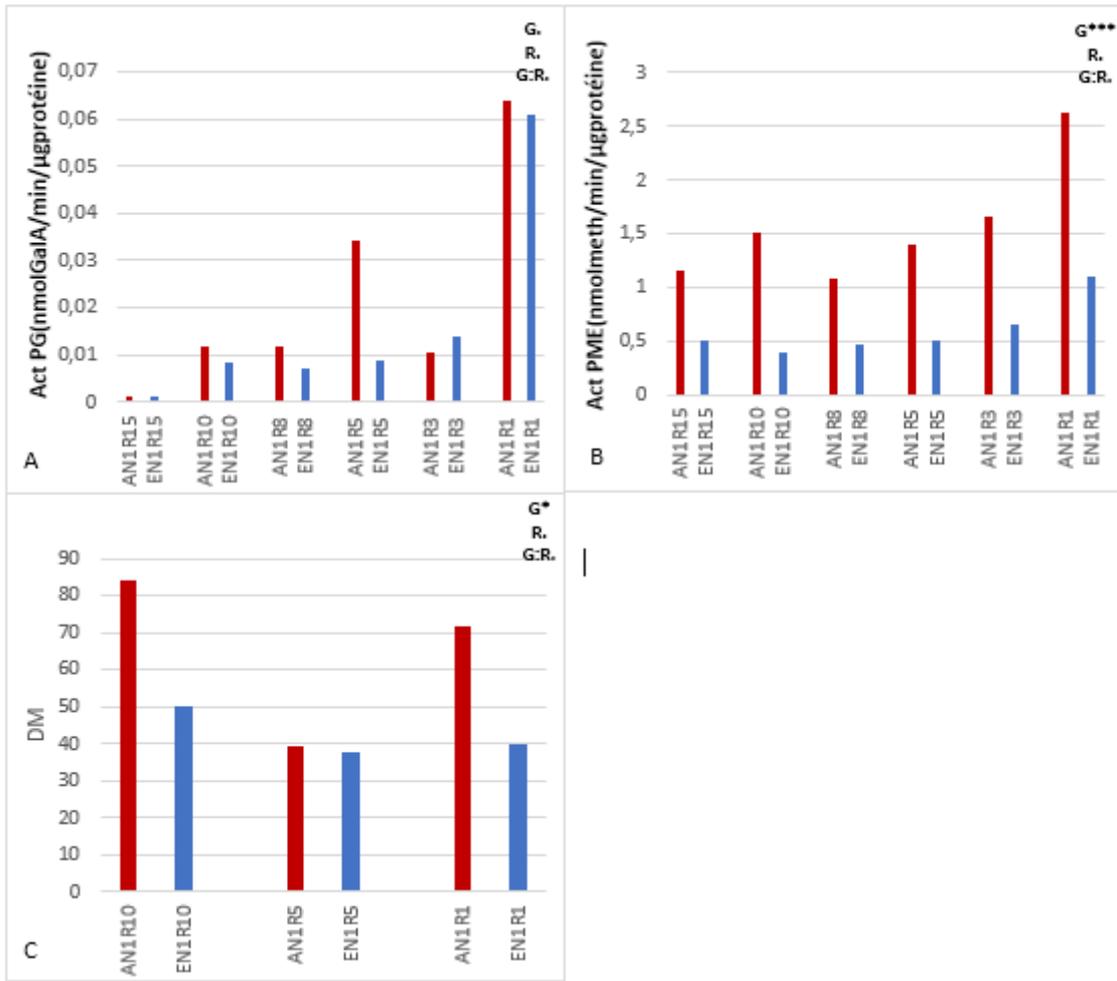


Figure-5. Activité des enzymes de modification de la paroi (PG, A ; PME,B) et degré de méthylation (C) en condition enrichie en azote (N1). Génotype Aviso (A) et Express (E) ; rang foliaire (R1 à R15) ; activité des polygalacturonases (PG) et pectinméthylestérases (PME) et degré de méthylation (DM). Effet obtenus par tests Anova : *** hautement significatif, ** très significatif, * significatif, . non significatif.

Tableau-I. Relation entre l'activité des pectinméthylestérases (PME) et polygalacturonases (PG) en condition enrichie en azote. Coefficient de corrélation entre activité des PGs et PMEs

	PG	PME
PG	1.00	
PME	0.58	1.00

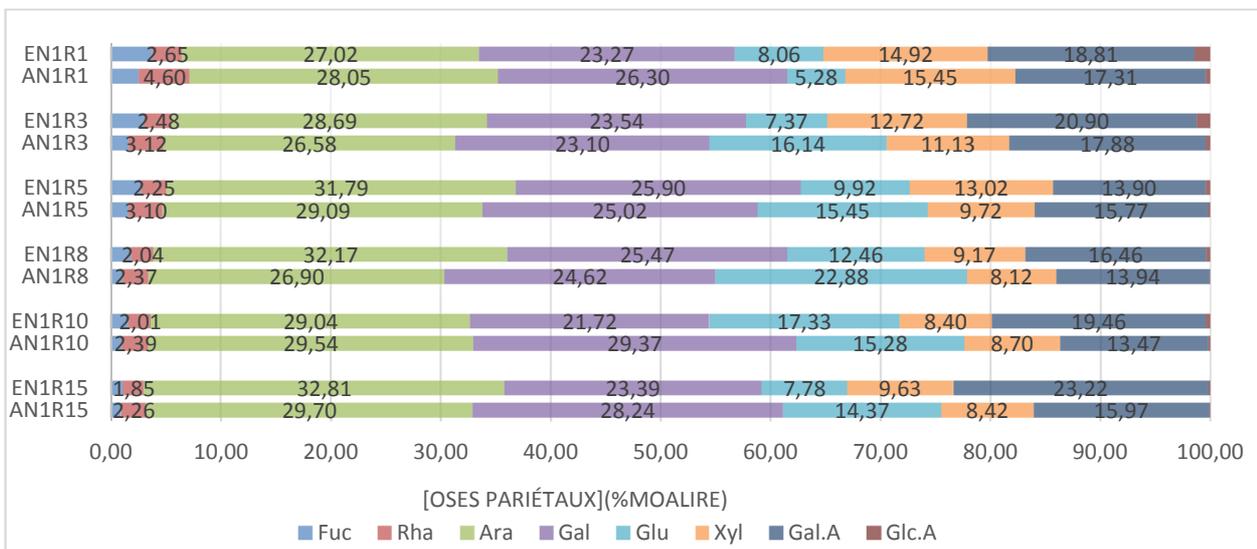


Figure-6. Teneur en oses pariétaux selon le génotype (A, E) et le rang foliaire (R) en condition enrichie en azote (N1). Génotype Aviso (A) et Express (E) ; rang foliaire (R1 à R15) ; Fuc,Fucose, Rha,Ramnose, Ara, Arabinose, Gal,Galactose, Glu,Glucose, Xyl,Xylose, Gal.A Acide Galaturonique, Glc.A, Acide glucuronique

1) Activité des enzymes de modification de la paroi

Pour l'activité des polygalacturonases (PGs), elle semble avoir tendance à augmenter avec le vieillissement quel que soit le génotype (Fig-5.A) et l'activité est légèrement plus importante pour Aviso par rapport à Express. Les analyses statistiques montrent qu'il n'y a pas d'effet significatif du rang ou du génotype. Les différences observées ne sont donc pas significatives en ce qui concerne l'activité des PGs. Pour l'activité des pectinméthylestérases (PMEs, Fig-5.B), celle-ci est plus importante quel que soit le rang considéré pour le génotype Aviso par rapport au génotype Express. La différence entre ces deux génotypes étant plus marquée pour le rang 10 puis pour les rangs 5 et 3. En cas de fertilisation azotée optimum le génotype Aviso montre donc une activité des PME's plus importante quel que soit le rang par rapport au génotype Express. Cependant pour l'activité des PME's, les analyses statistiques montrent que le génotype influence celle-ci de manière hautement significative mais le rang non. De plus, l'activité des PME's est positivement corrélée (0.58) à l'activité des PGs en comparant les points obtenus pour une même condition, une augmentation de l'activité des PME's peut donc induire une augmentation de l'activité des PGs (Tab-I).

Le degré de méthylation (DM) mesuré par FT-IR (Fig-5.C) montre qu'il est supérieur quelque-soit le rang pour le génotype Aviso par rapport au génotype Express, cependant la différence est moins importante pour le rang 5. Le DM semble avoir tendance à diminuer avec l'âge ce qui est concordant avec la tendance de l'activité des PME's à augmenter, celle-ci permettant de réduire le degré de méthylation des pectines. Cependant le degré de méthylation est plus important chez le génotype présentant une activité des PME's plus importante. L'effet du génotype semble également plus important en début et en fin de développement foliaire.

On peut donc conclure que l'activité des enzymes pariétales dépend du génotype observé dans en condition enrichie en azote.

2) Composition en oses neutres et acides de la paroi

Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressés à la composition des hémicelluloses et des pectines, éléments importants de la paroi. Nous avons quantifié les oses neutres et acides qui les composent dans les parois végétales après extractions et les résultats sont présentés figure 6.

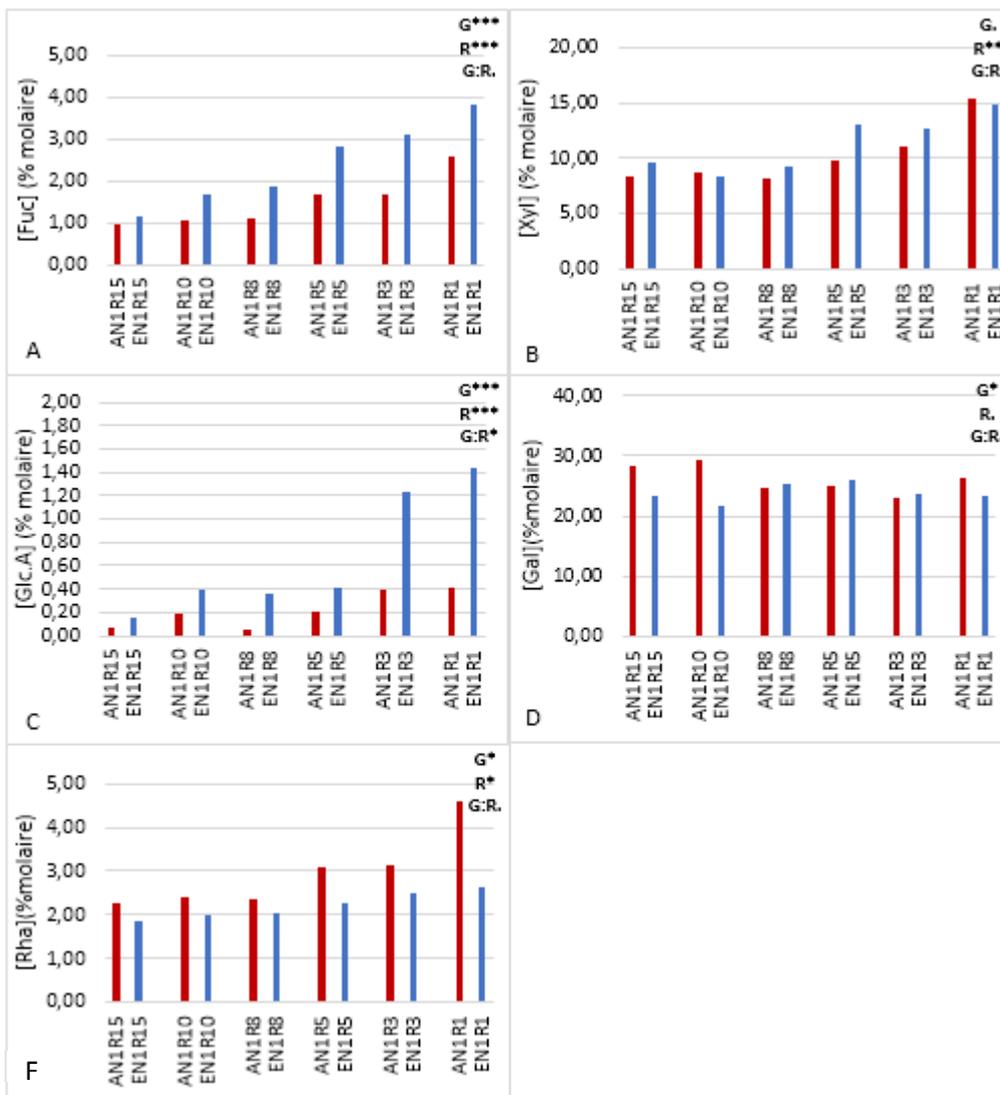


Figure-7. Teneur en oses pariétaux présentant une variation significative selon le génotype (A, E) et le rang foliaire (R) en condition enrichie en azote (N1). Génotype Aviso (A) et Express (E) ; rang foliaire (R1 à R15) ; Fuc, Fucose (A), Xyl, Xylose (B), Glc.A, Acide glucuronique (C), Gal, Galactose (D), Rha, Rhamnose (F). Effet obtenus par tests Anova : *** hautement significatif, ** très significatif, * significatif, . non significatif.

Tableau-II. Relation entre les pourcentages en oses pariétaux en condition enrichie en azote. Coefficient de corrélation entre les oses pariétaux.

	Fucose	Rhamnose	Arabinose	Galactose	Glucose	Xylose	Acide galacturonique	Acide glucuronique
Fucose	1.00							
Rhamnose	0.51	1.00						
Arabinose	0.18	0.14	1.00					
Galactose	0.10	0.46	0.60	1.00				
Glucose	-0.18	0.02	-0.17	-0.02	1.00			
Xylose	0.88	0.72	0.25	0.29	-0.35	1.00		
Acide galacturonique	0.32	0.15	0.34	-0.07	-0.04	0.38	1.00	
Acide glucuronique	0.84	0.26	-0.003	-0.06	-0.05	0.67	0.54	1.00

Quel que soit le rang et le génotype l'arabinose et le galactose représentent la plus grande part d'oses structuraux avec respectivement 29,28 % et 24,99 % en moyenne, constituant les rhamnogalacturonanes de type I et II des pectines. L'acide galacturonique ensuite avec 17,26 % que l'on retrouve sur la chaîne initiale des pectines. Puis le glucose, le xylose sont présent en quantité moins importante avec en moyenne 12,69 %, 10,78 % respectivement constituant des xyloglucanes. Tandis que le fucose et le rhamnose représentent un faible pourcentage molaire avec en moyenne 1,95 % (xyloglucanes, RG) et 2,59 % (RG) et l'acide glucuronique est très peu présent avec 0,44 % (RGII) en moyenne.

Seuls certains oses montrent une variation significative (Fig-7, Annexe-III). Le pourcentage molaire en fucose et acide glucuronique augmente avec l'âge des feuilles, c'est-à-dire que plus une feuille est âgée plus le taux en ces deux oses sera important (Fig-7.A,7.C). L'augmentation du fucose étant plus importante entre le rang 10 et le rang 5 par rapport à celle observée entre le rang 15 et le rang 10 et celle observée entre le rang 5 et le rang 1. L'augmentation de la teneur en fucose est donc plus importante en milieu et fin de développement foliaire, alors que celle en acide glucuronique est plus importante en début et surtout fin de développement foliaire. De plus pour ces deux composés la teneur est toujours plus importante pour le génotype Express par rapport à Aviso quel que soit le rang foliaire. Le rhamnose présente une augmentation de leur teneur au cours du développement foliaire de plus avec le galactose il présente une teneur plus importante chez le génotype Aviso par rapport au génotype Express (Fig-7.D,7.E). En parallèle une augmentation du pourcentage de xylose est observée surtout du rang 5 au rang 1 mais sans effet significatif du génotype (Fig-7.B).

Les analyses statistiques montrent que des effets du rang et/ou du génotype sont observés pour le taux de certains oses structuraux mesurés. L'effet du rang et du génotype sont significatifs pour le rhamnose. Pour le pourcentage molaire en fucose et en acide glucuronique le rang et le génotype montrent un impact hautement significatif. Alors que pour celui des xyloses seul l'effet du rang est très significatif et que pour le galactose seul le génotype présente un effet significatif. De plus des corrélations positives entre la teneur des différents oses considérés sont observées (Tab-II). Les corrélations les plus importantes étant celle entre la teneur en fucose et celle en xylose et celle entre le fucose et le galactose, avec un coefficient de corrélation respectivement de 0,88 et 0,84. De plus le coefficient de corrélation entre la teneur en acide galacturonique et en xylose est de 0,67. Ce qui correspond avec le fait que chacun de ces composants présente une teneur de plus en plus importante avec l'âge des feuilles.

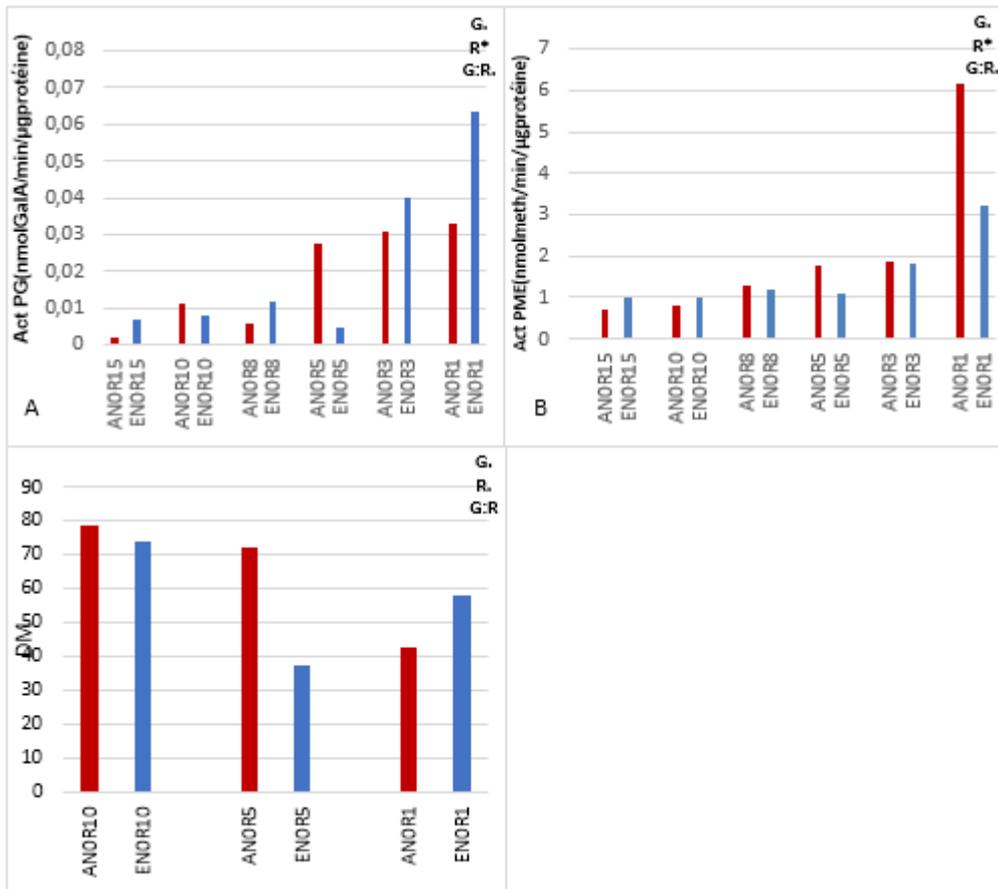


Figure-8. Activité des enzymes de modification de la paroi (PG,A ; PME,B) et degré de méthylation (C) en condition appauvrie en azote (N0). Génotype Aviso (A) et Express (E) ; rang foliaire (R1 à R15) ; activité des polygalacturonases (PG) et pectinméthylestérases (PME) le degré de méthylation (DM). Effet obtenus par tests Anova : *** hautement significatif, ** très significatif, * significatif, . non significatif.

Tableau-III. Relation entre l'activité des pectinméthylestérases (PME) et polygalacturonases (PG) en condition appauvrie en azote. Coefficient de corrélation entre activité des PGs et PMEs

	PG	PME
PG	1.00	
PME	0.35	1.00

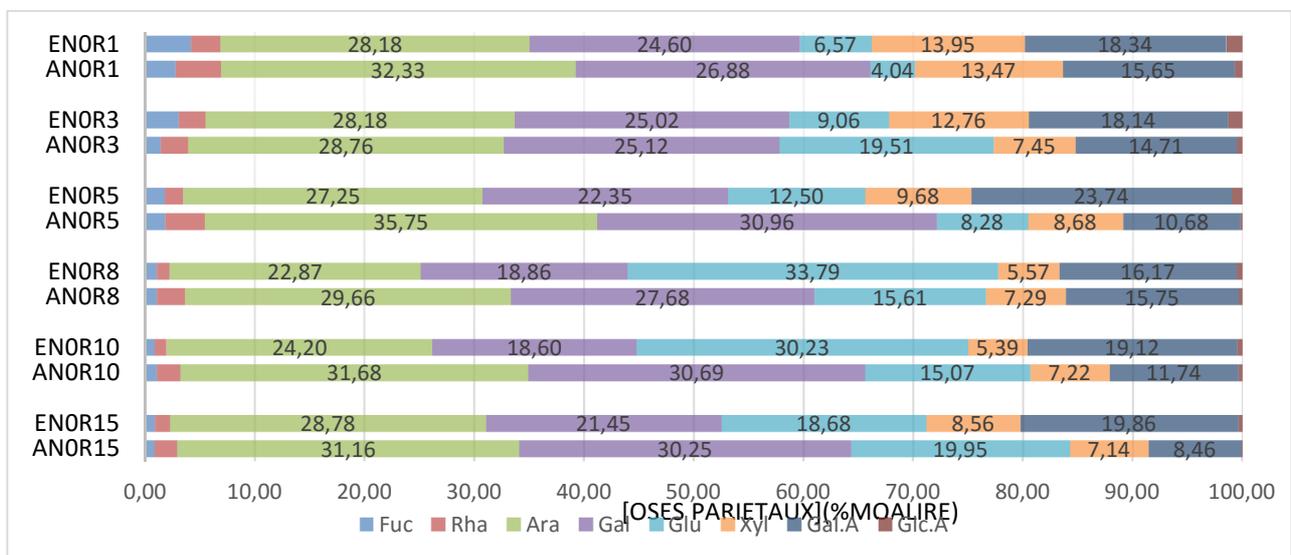


Figure-9. Teneur en oses pariétaux selon le génotype (A, E) et le rang foliaire (R) en condition appauvrie en azote (N0). Génotype Aviso (A) et Express (E) ; rang foliaire (R1 à R15) ; Fuc,Fucose, Rha,Ramnose, Ara, Arabinose, Gal,Galactose, Glu,Glucose, Xyl,Xylose, Gal.A Acide Galaturonique, Glc.A, Acide glucuronique

L'augmentation de la teneur de ces différents oses au cours du développement pourrait être expliquée par une présence plus importante de xyloglucane, celui-ci étant composé de glucose, xylose et fucose. Cette augmentation peut également s'expliquer par l'augmentation des ramifications présentes sur les domaines RGII pouvant être composées de fucose, xylose, rhamnose et galactose. Les ramifications pouvant être différentes entre les génotypes, le génotype Express présentant un taux de fucose et d'acide glucuronique plus important, alors qu'Aviso présente des teneurs en galactose et rhamnose plus importantes

B) Effet du développement foliaire et du génotype sur les modifications de la paroi en condition appauvrie en azote

Dans un deuxième temps, nous avons voulu comparer les deux génotypes cultivés en condition appauvrie en azote afin d'observer s'il y avait des différences au niveau de la paroi pour ces 2 génotypes et selon le rang foliaire.

1) Activité des enzymes de modification de la paroi

L'activité des PGs, présentée figure 8.A, montre une augmentation progressive avec l'âge des feuilles, l'augmentation étant plus importante pour le génotype Aviso à partir du rang 5 alors que pour Express c'est à partir du rang 3. L'activité des PME's présente une augmentation visible seulement à partir du rang 8 jusqu'au rang 1 (Fig-8.B).

L'activité des PME's permet de réduire le degré de méthylation des pectines. Malgré une activité des PME's qui augmente avec l'âge des feuilles, la diminution du degré de méthylation ne semble pas significative (Fig-8.C) d'après les données statistiques et aucun impact significatif du rang n'est observé en cas d'appauvrissement en azote.

Ainsi, le rang présente une influence significative sur l'activité des PGs et des PME's mais le génotype ne présente pas d'effet. De plus une faible corrélation positive est visible entre l'activité des PGs et celle des PME's (0.35) (Tab-III). Cela est en accord avec le fait que l'activité de ces deux enzymes est de plus en plus importante avec l'âge des feuilles.

2) Composition en oses neutres et acides de la paroi

Dans un deuxième temps nous avons quantifié les oses neutres et acides présents dans les parois végétales après extractions et les résultats sont présentés figure 9. Quel que soit le rang, l'arabinose et le galactose représentent la plus grande part d'oses structuraux avec

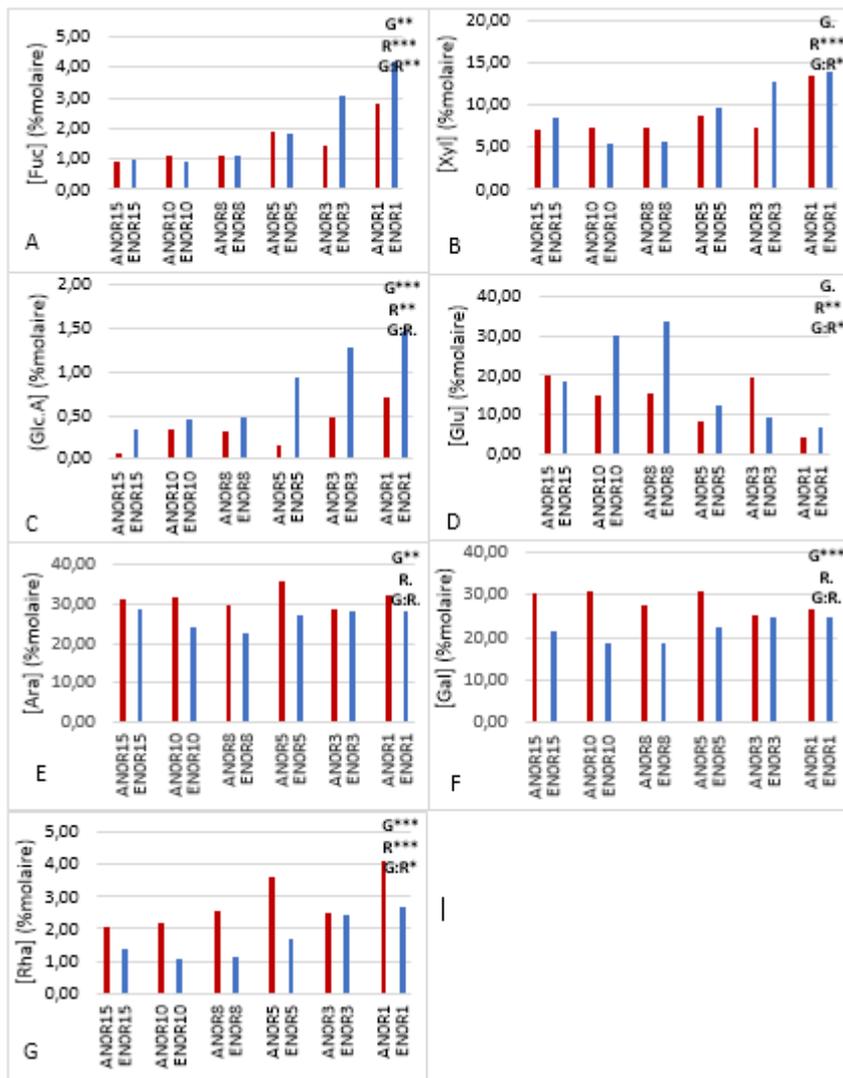


Figure-10. Teneur en oses pariétaux présentant une variation significative selon le génotype (A, E) et le rang foliaire (R) en condition appauvrie en azote (N0). Génotype Aviso (A) et Express (E) ; rang foliaire (R1 à R15) ; Fuc, Fucose (A), Xyl, Xylose (B), Glc.A, Acide glucuronique (C), Glu, Glucose (D), Ara, Arabinose (E), Gal, Galactose (F), Rha, Rhamnose (G). Effet obtenus par tests Anova : *** hautement significatif, ** très significatif, * significatif, . non significatif.

respectivement 29,07 % et 25,21 % en moyenne. Une exception à ceci est pour les rangs 10 et 8 du génotype Express où la teneur en glucose est plus importante. Ensuite le glucose, le xylose et l'acide galacturonique sont présent en quantité moins importante avec en moyenne 16,11 %, 8,93 % et 16,11 %. Tandis que le fucose et le rhamnose représentent un faible pourcentage molaire avec en moyenne 1,95 % et 2,59 % et l'acide glucuronique est très peu présent avec 0,44% en moyenne.

L'impact du rang et du génotype sont hautement significatifs pour la teneur en rhamnose (Annexe-IV). Tandis que pour la teneur en fucose le rang montre une incidence hautement significative et celle du génotype est très significative, et que pour la teneur en acide glucuronique le génotype induit une variation hautement significative et celle du rang est très significative. Alors que pour la teneur en xylose seul le rang montre une influence hautement significative. De plus l'effet du génotype est très significatif pour la teneur en galactose et en arabinose, et celui du rang pour la teneur en glucose.

En général, les teneurs en fucose, rhamnose, xylose et acide glucuronique augmentent avec le vieillissement des feuilles (Fig-10.A, 10.G, 10.B, 10.C). De plus pour les teneurs en rhamnose, galactose (Fig-10.F) et arabinose (Fig-10.E) sont supérieures pour le génotype Aviso par rapport au génotype Express, alors que pour celle en acide glucuronique l'inverse est observée. Pour la teneur en fucose celle-ci est plus importante chez Aviso du rang 15 au rang 5 puis dans les rangs 3 et 1 c'est dans le génotype Express qu'elle devient plus importante. Pour la teneur en glucose, le génotype Aviso montre une diminution de celle-ci sauf pour le rang 3, alors que le génotype Express montre une augmentation du rang 15 au rang 8 puis une diminution (Fig-10.D). L'augmentation de la teneur en fucose et xylose est plus importante au milieu du développement (R10 à R5) et en fin de développement (R5 à R1), alors que celle en rhamnose est plus importante au milieu du développement et celle en acide glucuronique en début (R15 à R10) puis en fin de développement. En parallèle la diminution en glucose est plus importante en milieu puis en fin de développement.

Tableau-IV. Relation entre les pourcentages en oses pariétaux en condition appauvrie en azote. Coefficient de corrélation entres les oses pariétaux.

	Fucose	Rhamnose	Arabinose	Galactose	Glucose	Xylose	Acide galacturonique	Acide glucuronique
Fucose	1.00							
Rhamnose	0.60	1.00						
Arabinose	0.36	0.65	1.00					
Galactose	0.29	0.59	0.91	1.00				
Glucose	-0.29	-0.38	-0.19	-0.13	1.00			
Xylose	0.87	0.65	0.36	0.29	-0.46	1.00		
Acide galcturonique	0.31	0.18	-0.19	-0.28	0.18	0.44	1.00	
Acide glucuronique	0.77	0.28	-0.13	-0.11	-0.08	0.77	0.70	1.00

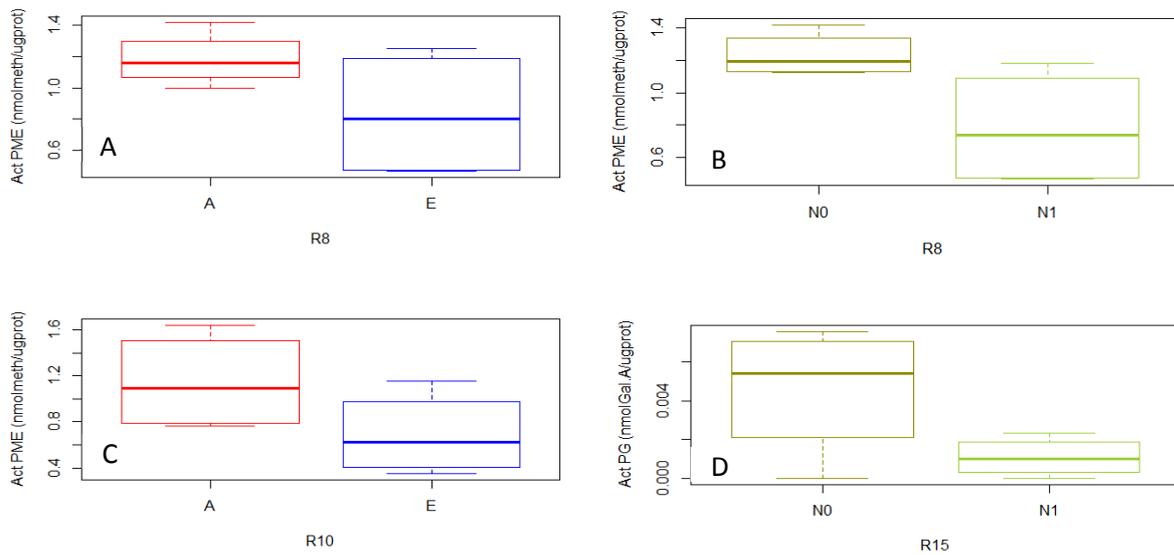


Figure-11. Comparaison des activités enzymatique (PG, PME) selon le génotype (A,E) et le traitement azoté (N1, N0). Génotype Aviso (A) et Express (E); traitement enrichie (N1= ou appauvri (N0) en azote; rang foliaire (R8, R10, R15); activité des polygalacturonases (PG, D) et pectinméthylestérases (PME, A,B,C).

De plus certaines teneurs en oses montrent des corrélations positives comprises entre 0,59 et 0,91 (Tab-IV). Les teneurs en oses augmentant avec le vieillissement (fucose, rhamnose, xylose et acide glucuronique) sont positivement corrélés entre elles, en effet les coefficients de corrélation entre le fucose et les autres oses sont compris entre 0,60 et 0,87, celui entre le rhamnose et xylose est de 0,65 et celui entre l'acide glucuronique et le xylose 0,77. De même, pour le génotype Aviso, on observe des coefficients de corrélation de 0,65 et 0,59 pour le rhamnose par rapport à l'arabinose et le rhamnose par rapport au galactose, et un coefficient de corrélation de 0,91 entre l'arabinose et le galactose.

Comme constaté en condition enrichie en azote l'augmentation des différents oses semble être en faveur d'une augmentation du taux de xyloglucane mais aussi une augmentation des ramifications des domaines RGII. Cependant le génotype Aviso présente une teneur plus importante en ces différents oses sauf pour l'acide glucuronique, celui-ci présentera donc une ramification plus importante des domaines RGI.

C) Effet du traitement azoté selon le rang et le génotype sur les activités enzymatiques et la composition de la paroi

A partir des données obtenues dans les expériences précédentes, nous avons analysé quel est l'effet de la fertilisation azotée et du génotype sur les variables considérées lors de cette étude selon un rang donné. Mais aussi analyser l'effet de la fertilisation azotée sur ces différentes variables selon chaque génotype.

1) Effet du traitement azoté et du génotype

Sur la figure 11 sont représentés les effets du traitement et/ou génotype pour l'activité des PME ou des PGs pour les rangs 8, 10 et 15, rangs montrant des variations statistiquement significatives. On observe que l'activité des PME pour les rangs 8 et 10 est en moyenne plus importante pour le génotype Aviso par rapport au génotype Express (Fig-11.A.11.C). Le traitement azoté montre un effet très significatif pour le rang 8 sur l'activité des PME, celle-ci étant plus importante en cas d'appauvrissement en azote (Fig-11.B).

De plus, le traitement azoté induit une variation significative pour le rang 15 de l'activité des PGs (Fig-11.D). Cette activité est plus importante en moyenne en cas de déficience en azote. L'effet du traitement azoté et du génotype sur les différentes activités enzymatiques semblent donc plus important au début du développement foliaire.

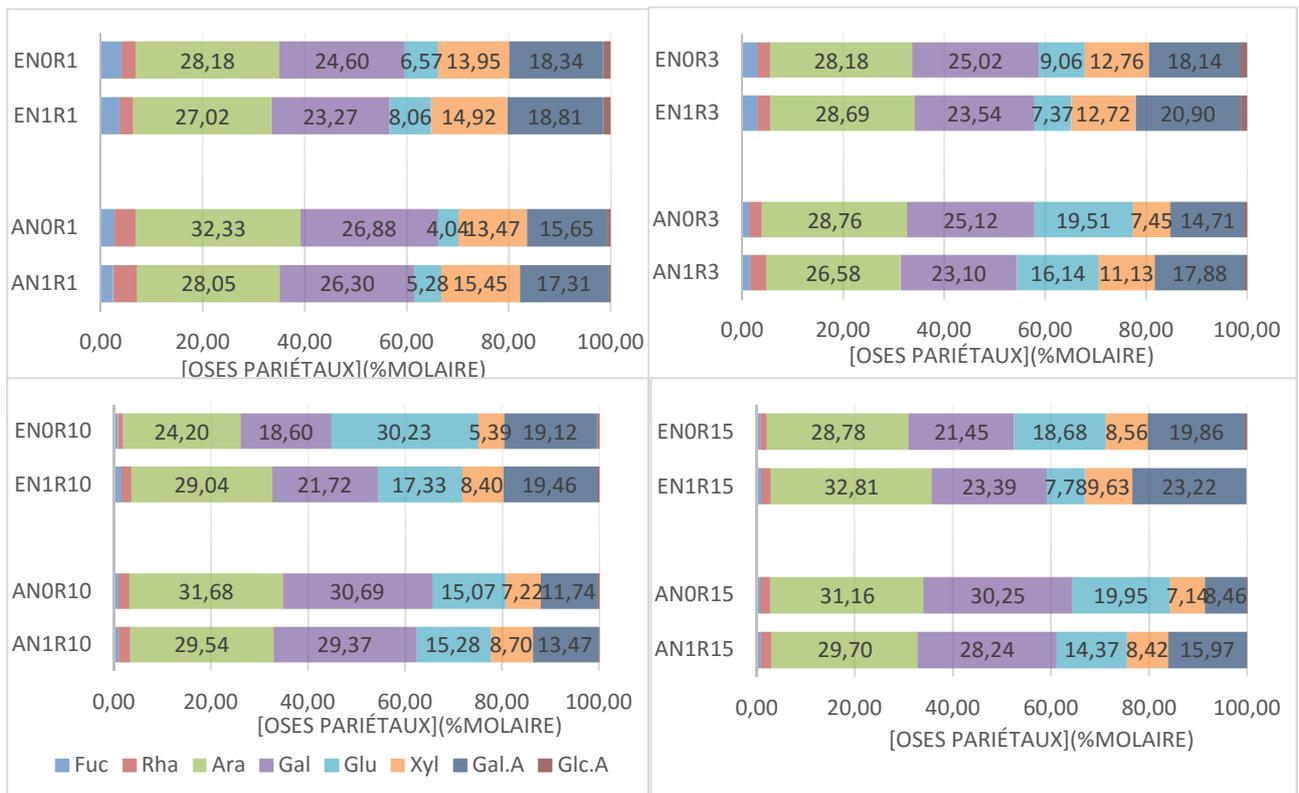


Figure-12. Comparaison de la teneur en oses pariétaux selon le génotype (A, E) et le traitement azoté (N1, N0). Génotype Aviso (A) et Express (E) ; traitement enrichi (N1) et appauvri (N0) en azote ; rang foliaire (R1, R3, R10, R15) ; Fuc,Fucose, Rha,Ramnose, Ara, Arabinose, Gal,Galactose, Glu,Glucose, Xyl,Xylose, Gal.A Acide Galaturonique, Glc.A, Acide glucuronique.

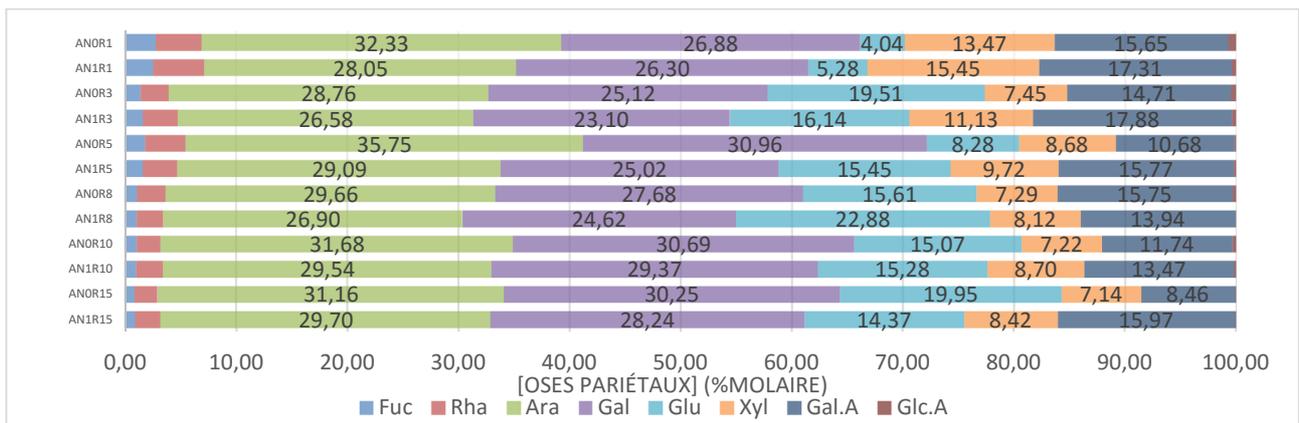


Figure-13. Teneur en oses pariétaux selon le traitement azoté (N1, N0) pour le génotype Aviso (A). Traitement enrichi (N1) et appauvri (N0) en azote ; rang foliaire (R1 à R15) ; Fuc,Fucose, Rha,Ramnose, Ara, Arabinose, Gal,Galactose, Glu,Glucose, Xyl,Xylose, Gal.A Acide Galaturonique, Glc.A, Acide glucuronique.

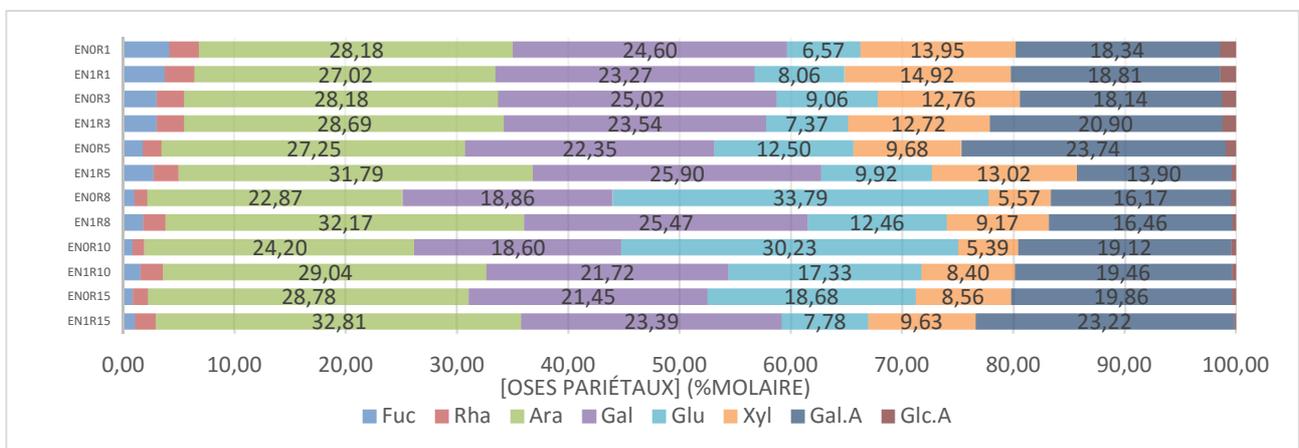


Figure-14. Teneur en oses pariétaux selon le traitement azoté (N1, N0) pour le génotype Express (E). Traitement enrichi (N1) et appauvri (N0) en azote ; rang foliaire (R1 à R15) ; Fuc,Fucose, Rha,Ramnose, Ara, Arabinose, Gal,Galactose, Glu,Glucose, Xyl,Xylose, Gal.A Acide Galaturonique, Glc.A, Acide glucuronique.

Ensuite, nous avons poursuivis cette analyse sur la composition en oses de la paroi. Sur la figure 12 sont présentées les compositions en oses pariétaux en fonction du génotype et du traitement azoté pour les rangs montrant des variations significatives. La teneur en rhamnose est en moyenne plus importante pour le génotype Aviso par rapport au génotype Express pour les rangs 1 et 10, comme la teneur en galactose pour les rangs 10 et 15. De plus la teneur en rhamnose est plus importante en cas de déficience en azote pour le génotype Express. Alors que la teneur en acide galacturonique pour les rangs 1 et 15, en fucose pour le rang 3 sont en moyenne plus importantes pour le génotype Express par rapport au génotype Aviso. Et la teneur en acide galacturonique est supérieur en cas de déficience en azote quel que soit le génotype. L'impact du génotype est donc visible en début et fin de développement foliaire alors que celui du traitement azoté semble plus présent en début de développement foliaire concordant avec une demande importante des feuilles en croissance.

2) Effet du traitement azoté selon le génotype considéré

Un dernier type d'analyse peut être réalisé en comparant l'effet de l'enrichissement ou de l'appauvrissement en azote sur le développement de la plante. Pour le génotype Aviso un effet significatif du traitement azoté est seulement observé pour la teneur en xylose (Fig-13). Quel que soit le rang considéré celle-ci est toujours supérieure en cas de déficience en azote. Cet effet est plus important pour le rang 3 par rapport aux autres rangs foliaires.

Pour le génotype Express, sensible à la déficience en azote, cet élément montre un effet très significatif pour l'activité des PME et la quasi-totalité des oses pariétaux (arabinose, glucose, xylose, fucose, galactose et acide glucuronique ; Fig-14). La teneur en arabinose et en xylose est toujours plus faible en cas de déficience en azote, cette différence étant plus importante pour le rang 8. Tandis que la teneur en acide glucuronique, glucose, fucose et galactose est plus importante en cas de déficience en azote. Le traitement azoté a donc moins d'effet sur la paroi du génotype Aviso que sur celle du génotype express.

IV-Discussion

La sénescence séquentielle présente un impact majeur sur les rendements chez le colza, l'étude de cette phase présente donc un intérêt pour l'amélioration de ceux-ci. En effet malgré une forte absorption de l'azote minéral fournit à la plante une fertilisation azotée importante est nécessaire (160-250 kg/ha, *Rathke et al.*, 2005). Cela est dû à la faible capacité de remobilisation de l'azote lors de la sénescence pendant la phase végétative chez le colza (*Avice et Etienne*, 2014). Une absence de fertilisation azotée a alors pour conséquence une induction de la sénescence chez les vieilles feuilles et des modifications moléculaires et physiologiques interviennent chez les jeunes feuilles afin de retarder la sénescence (*Gombert et al.*, 2006). L'étude menée au cours de ce stage fait partie d'un projet cherchant à identifier les acteurs responsables de ces modifications structurales observées au niveau du parenchyme palissadique des feuilles chez le colza au cours du développement végétatif (*Musse et al.*, 2013). Cette étude avait pour but de mettre en avant un potentiel effet de l'azote sur les modifications de la paroi, mais aussi de comparer le comportement de deux génotypes, un génotype sensible au manque d'azote Express et un adapté Aviso. Pour cela 6 rangs foliaires ont été choisis afin de pouvoir couvrir plusieurs stades de développement, allant du stade le plus sénescé R1 au stade le plus jeune R15. Les génotypes ont été choisis par leurs réponses contrastées à la déficience en d'azote. Pour cela l'activité d'enzymes de modification de la paroi (PGs, PME et PAEs) et la composition en oses structuraux et solubles ont été suivies.

A) Modifications de la paroi lors du développement foliaire

L'activité des PGs et des PME augmentent tout au long du vieillissement de la feuille, cette augmentation étant plus importante pour l'activité des PGs. Le développement foliaire induit donc une activité plus importante de ces deux enzymes de modification des pectines comme chez les fruits où leurs actions combinées entraînent la déstructuration des tissus et par la suite conduit à la sénescence de ceux-ci (*Koukounaras et al.* 2007). Cependant, l'activité des PME dépend du génotype, Aviso présentant toujours une activité 2 fois plus élevée qu'Express en condition enrichie en azote. Différence que l'on ne retrouve plus en condition appauvrie en azote. Pour les PGs aucune différence entre les génotypes ne semble être observée quelque soit les conditions de culture.

Malgré cette augmentation des activités enzymatiques, aucun effet significatif du rang n'est observé sur le degré de méthylation des pectines. Cependant on peut noter une tendance vers la baisse de celui-ci avec le développement qui coïnciderait avec l'augmentation des

activités enzymatiques, mais la grande variabilité des mesures effectuées fait que cela n'est pas significatif, il serait donc intéressant d'étudier d'autres répétitions biologiques.

De précédentes études ont mis en avant que certains stress tel que le taux d'ozone et de dioxyde de carbone élevés induisent une augmentation de l'activité des PME (LeGall *et al.*, 2015). De plus, en cas d'acclimatation au froid, une augmentation de l'expression de gènes du métabolisme de la paroi incluant les PME est observée chez *Miscanthus*, ce qui induit une perte de cohésion ou un allongement de la paroi (Domon *et al.*, 2013). Cela se retrouve dans cette étude mais d'une manière significative uniquement dans des feuilles encore assez jeunes. En effet, une augmentation de l'activité des PME est observée au rang 8 (Fig-11) en condition de déficience en azote, ce qui pourrait donc permettre une augmentation de la taille des cellules synonyme d'un début de senescence (Musse *et al.*, 2013). Des mesures supplémentaires sont nécessaires afin de voir si cette tendance se poursuit sur les rangs un peu plus âgés. N'ayant analysés que 2 répétitions par condition, d'autres pourraient être étudiées afin d'affiner ces résultats. Cependant d'autres processus pourraient avoir un impact sur cette augmentation de la taille des cellules, l'effet étant moins visible en cas de condition enrichie en azote.

L'étude de la composition en oses de la paroi (Fig-2) permet de mettre en évidence la présence des mêmes oses majoritaires et minoritaires quel que soit le rang observé. Les oses majoritaires sont l'arabinose, le galactose et l'acide galacturonique pouvant représenter des homogalacturonanes et domaines RGI des pectines. L'arabinose et le galactose se retrouvant également dans les hémicelluloses au niveau de xyloglucanes et/ou d'hétéroxylanes. Ensuite, viennent le glucose, le xylose pouvant indiquer la présence de xyloglucanes. Tandis que le fucose, le rhamnose et l'acide glucuronique sont minoritaires et représentent le plus faible pourcentage d'oses pariétaux, ceux-ci pouvant être présent au niveau de domaines RGII des pectines.

Il a été mis en évidence aussi des différences dans la composition en oses (Fig-7) entre les différents rangs foliaires étudiés et donc au long du développement des feuilles. Le xylose, rhamnose, fucose et acide glucuronique augmentent avec le vieillissement. Cela concorde avec des résultats déjà observés chez l'épinard (Gutiérrez-Rodríguez *et al.*, 2012). Les modifications du pourcentage de ces 4 oses pariétaux pourraient être expliquées par une accumulation de ces oses sur les chaînes latérales des pectines (RGI ou RGII), entraînant une désolidarisation des pectines et une perte de cohésion entre les cellules. Le xylose, le rhamnose et le fucose se retrouvent aussi au niveau des hémicelluloses (xyloglucanes) où leur incorporation au niveau des ramifications de la chaîne principale (glucose) contribue au même phénomène observé

chez les pectines. Le xylose est un ose très présent dans la paroi du colza (Kubacka-Zebalska et Kacperska, 1999) où il est présent de manière plus importante dans les hémicelluloses (25%) que dans les pectines (3%). Son augmentation lors du développement serait associée à la formation d'hétéroxylane, composé que l'on retrouve au niveau de paroi secondaire signe de cellule en vieillissement (Uddin *et al.*, 2013). Malgré une petite différence de composition entre les génotypes Aviso et Express, on observe la même tendance, à savoir une augmentation de la teneur des 4 oses cités ci-dessus.

B) Effet du traitement azoté sur la paroi

L'appauvrissement en azote présente un effet plus important chez le génotype Express par rapport au génotype Aviso, ce qui reste en accord avec la sensibilité d'Express vis à vis de la déficience en azote. De manière globale le traitement azoté présente un effet seulement sur la teneur en xylose chez le génotype Aviso. Tandis que pour le génotype Express celui-ci présente un effet sur l'activité des PME mais aussi sur le pourcentage en arabinose, glucose, xylose, fucose, galactose et acide glucuronique.

Le xylose présente la même tendance quel que soit le génotype, celui-ci montrant un pourcentage plus faible. Le type de ramification touchées par une baisse de ses oses est surtout composé d'arabinose, de xylose, oses présents au niveau des pectines (RGI et II) ou des hémicelluloses (hétéroxylanes). Tandis que le glucose, l'acide glucuronique, le fucose et le galactose dont la teneur semble augmenter, cela peut correspondre à une composition plus importante en ramification de type RGII, mais aussi en xyloglucane.

Ces changements au niveau des ramifications d'oses pariétaux ont déjà été observés en cas de stress froid ou hydrique (Domon *et al.*, 2013), ce phénomène pourrait permettre à la paroi d'éloigner les différents composés pariétaux entre eux et ainsi de la rendre plus poreuse laissant passer l'eau et les minéraux (azote par exemple) plus facilement. Ce phénomène est aussi en accord avec l'hypothèse qu'au cours du vieillissement les cellules s'élargissent et se gorge d'eau (Musse *et al.*, 2013).

En comparant un même rang foliaire pour nos 2 conditions azotées, un effet été mis en évidence seulement pour 4 rangs foliaires (1, 3, 10 et 15). C'est-à-dire des jeunes et des vieilles feuilles. Cela peut être dû à des états physiologiques différents pour un rang foliaire entre les deux conditions avec et sans stress azoté. Il serait donc intéressant de replacer les rangs foliaires selon un même état physiologique entre les deux traitements grâce au « split » dont la caractérisation a été obtenue grâce aux mesures RMN.

V-Conclusion et perspectives

Cette étude dont le but était de relier les modifications structurales observées au cours du développement des feuilles (Musse *et al.*, 2013) à des modifications de la composition de la paroi a permis de mettre en évidence i) l'impact du développement foliaire sur la structure pariétale ii) l'impact du traitement azoté sur celle-ci iii) d'observer des modifications des chaînes latérales des pectines et des hémicelluloses au cours du développement.

Afin d'affiner ces résultats il serait intéressant de réaliser les différentes analyses sur un plus grand nombre de répétitions, afin de limiter le biais pouvant être due aux blocs, chaque bloc représentant ici une plante. De plus des comparaisons faites par rapport au « split » pourraient être intéressantes afin de comparer les rangs foliaires présentant un même état physiologique entre les différents traitements et génotypes.

Au cours de la sénescence la teneur totale en protéine est impactée ainsi que la biomasse fraîche c'est pourquoi des calculs réalisés par rapport à la masse surfacique foliaire prélevée permettrait d'obtenir des résultats plus proches de l'évolution de la paroi au cours du développement. De plus des corrélations entre les différentes analyses réalisées et les résultats obtenus par RMN pourraient être réalisées afin de voir si l'évolution des modifications observées au niveau de la paroi sont liés à l'évolution des composantes observées par RMN.

Afin de mettre en avant l'évolution de chaque composant de la paroi (pectine, hémicellulose) une analyse séquentielle de la composition de ces différents éléments serait intéressante. Cela permettrait de savoir au sein de quelle fraction de la paroi la composition en oses est impactée. De plus l'impact du développement semblant plus important sur la ramification des composés de la paroi l'étude d'enzyme impliquée dans ce processus tel que les xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) et xyloglucan endotransglycosylases (XET) pourrait permettre une meilleure compréhension de ce phénomène.

VI-Bibliographie

- Andrews, M., Raven, J.A., and Lea, P.J. (2013). Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants: Do plants need nitrate? *Annals of Applied Biology* 163, 174-199
- Carpita, N.C., Defernez, M., Findlay, K., Wells, B., Shoue, D.A., Catchpole, G., Wilson, R.H., and McCann, M.C. (2001). Cell Wall Architecture of the Elongating Maize Coleoptile. *PLANT PHYSIOLOGY* 127, 551-565.
- Daher, F.B., Braybrook, S.A. (2015). How to let go: pectin and plant cell adhesion. *Frontier in Plant Science* 6, 523.
- Domon, J.-M., Baldwin, L., Acket, S., Caudeville, E., Arnoult, S., Zub, H., Gillet, F., Lejeune-Hénaut, I., Brancourt-Hulmel, M., Pelloux, J., et al. (2013). Cell wall compositional modifications of *Miscanthus* ecotypes in response to cold acclimation. *Phytochemistry* 85, 51-61.
- Fleischer, A., O'Neill, M.A., and Ehwald, R. (1999). The Pore Size of Non-Graminaceous Plant Cell Walls Is Rapidly Decreased by Borate Ester Cross-Linking of the Pectic Polysaccharide Rhamnogalacturonan II. *Plant Physiology* 121, 829-838.
- Gombert, J., Etienne, P., Ourry, A., Le Dily, F. (2006). The expression patterns of SAG12/Cab genes reveal the spatial and temporal progression of leaf senescence in *Brassica napus* L. with sensitivity to the environment. *Journal of Experimental Botany* 57, 1948-1956.
- Gutiérrez-Rodríguez, E., Lieth, H.J., Jernstedt, J.A., Labavitch, J.M., Suslow, T.V., Cantwell, M.I. (2012). Texture, composition and anatomy of spinach leaves in relation to nitrogen fertilization. *Journal Science Food Agriculture* 93, 227-237.
- Höfte, H., Voxeur, A., (2017). Plant cell walls. *Current Biology Magazine* 27, 853-909.
- Hocq, L., Pelloux, J., and Lefebvre, V. (2017). Connecting Homogalacturonan-Type Pectin Remodeling to Acid Growth. *Trends in Plant Science* 22, 20-29.
- Kant, S., Bi, Y.-M., and Rothstein, S.J. (2011). Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany* 62, 1499-1509.
- Koukounaras, A., Siomos, A., Sfakiotakis, E. (2007) Postharvest CO₂ and ethylene production and quality of rocket (*Eucra sativa* Mill) leaves as affected by leaf age and storage temperature. *Postharvest Biology and Technology* 46, 167-173.
- Kubacka-Zebalska, M., Kacperska, A. (1999). Low temperature-induced modifications of cell wall content and polysaccharide composition in leaves of winter oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *oleifera* L.). *Plant Science* 148, 59-67.
- Le Gall, H., Philippe, F., Domon, J.-M., Gillet, F., Pelloux, J., and Rayon, C. (2015). Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. *Plants* 4, 112-166.
- L'Enfant, M., Domon, J.-M., Rayon, C., Desnos, T., Ralet, M.-C., Bonnin, E., Pelloux, J., and Pau-Roblot, C. (2015). Substrate specificity of plant and fungi pectin methylesterases: Identification of novel inhibitors of PMEs. *International Journal of Biological Macromolecules* 81, 681-691.

Louvet, M., Rayon, C., Domon, J.M., Rusterucci, C., Fournet, F., Leaustic, A., Crépeau, M.J., Ralet, M.C., Rihouey, C., Bardor, M., Lerouge, P., Gillet, F., Pelloux, J. (2011) Major changes in cell wall during silique development in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 72, 59-67.

Manrique, G.D., Lajolo, F.M (2002). FT-IR spectroscopy as tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. *Postharvest Biology and technology* 25, 99-107.

Musse, M., De Franceschi, L., Cambert, M., Sorin, C., Le Caherec, F., Burel, A., Bouchereau, A., Mariette, F., and Leport, L. (2013). Structural Changes in Senescing Oilseed Rape Leaves at Tissue and Subcellular Levels Monitored by Nuclear Magnetic Resonance Relaxometry through Water Status. *PLANT PHYSIOLOGY* 163, 392–406.

Nelson, N. (1994) A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153:375-380.

Pelloux, J., Rusterucci, C., and Mellerowicz, E. (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science* 12, 267–277.

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

Rathke, G.W., Christen, O., Diepenbrock, W. (2005). Effects of nitrogen source and rate on productivity and quality of winter oilseed rape (*Brassica napus L.*) grown in different crop rotations. *Field Crops Research* 94, 103-113.

Roger, H., and Munné-Bosch, S. (2016). Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species and Redox Signaling during Leaf and Flower Senescence: Similar But Different. *Plant Physiology* 171, 1560–1568.

Sénéchal, F., Graff, L., Surcouf, O., Marcelo, P., Rayon, C., Bouton, S., Mareck, A., Mouille, G., Stintzi, A., Höfte, H., et al. (2014a). *Arabidopsis* PECTIN METHYLESTERASE17 is co-expressed with and processed by SBT3.5, a subtilisin-like serine protease. *Annals of Botany* 114, 1161–1175.

Sénéchal, F., Wattier, C., Rustérucci, C., and Pelloux, J. (2014b). Homogalacturonan-modifying enzymes: structure, expression, and roles in plants. *Journal of Experimental Botany* 65, 5125–5160.

Sénéchal, F., L'Enfant, M., Domon, J.-M., Rosiau, E., Crépeau, M.-J., Surcouf, O., Esquivel-Rodriguez, J., Marcelo, P., Mareck, A., Guérineau, F., et al. (2015). Tuning of Pectin Methylesterification: PECTIN METHYLESTERASE INHIBITOR 7 MODULATES THE PROGRESSIVE ACTIVITY OF CO-EXPRESSED PECTIN METHYLESTERASE 3 IN A pH-DEPENDENT MANNER. *Journal of Biological Chemistry* 290, 23320–23335.

Sorin, C., Musse, M., Mariette, F., Bouchereau, A., and Leport, L. (2015). Assessment of nutrient remobilization through structural changes of palisade and spongy parenchyma in oilseed rape leaves during senescence. *Planta* 241, 333–346.

Sorin, C., Leport, L., Cambert, M., Bouchereau, A., Mariette, F., and Musse, M. (2016). Nitrogen deficiency impacts on leaf cell and tissue structure with consequences for senescence associated processes in *Brassica napus*. *Botanical Studies* 57.

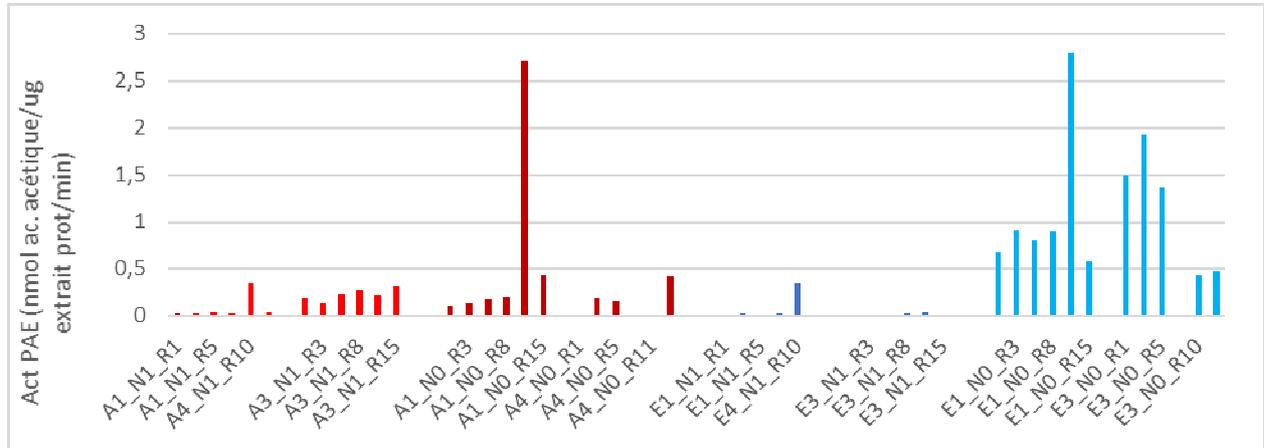
Souza, H.A.L. de, Bentes, Á. de S., Ladeira, T.M.S., Lopes, A.S., and Pena, R. da S. (2013).

Physicochemical properties of three sugary cassava landraces. *Ciência Rural* 43, 792–796.

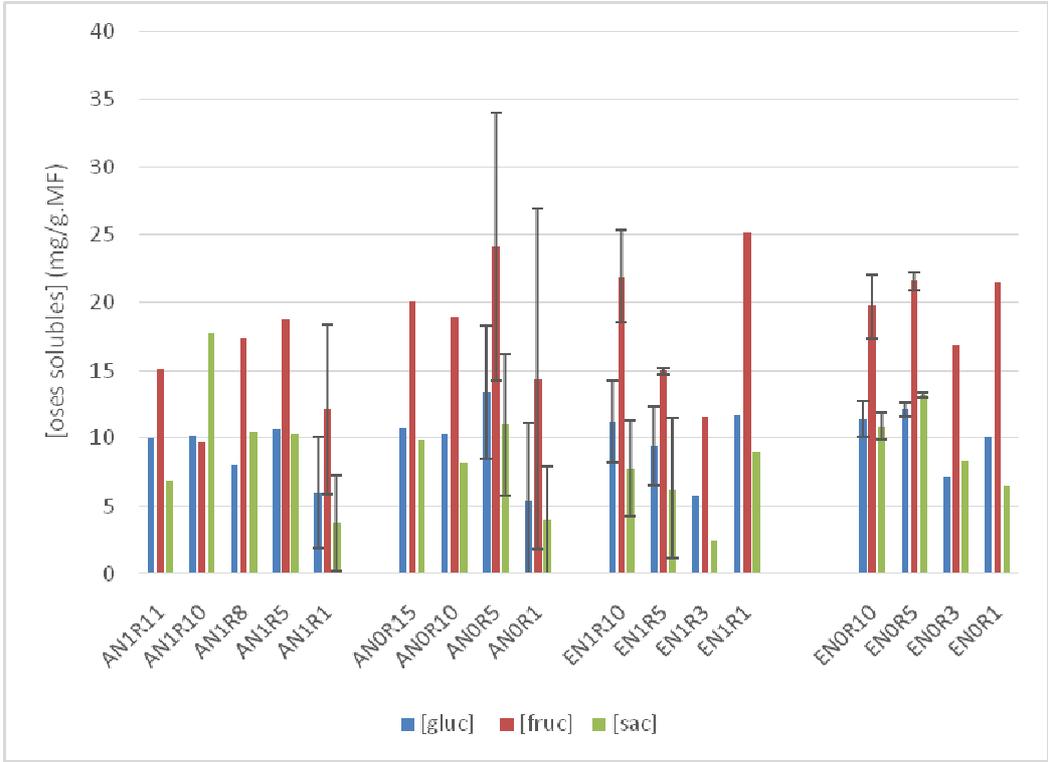
Uddin, M.N., Hanstein, S., Leubner, R., Schubert, S. (2013). Leaf cell-wall components as influenced in the first phase of salt stress in three maize (*Zea mays* S.) hybrids differing in salt resistance. *Journal Agriculture Crop Science* 199, 405-415.

Vorwerk, S., Somerville, S. Somerville, C. (2004). The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Plant Science* 9, 1360-1385.

Anexe I : Activité des pectineacétylestérases (PAE). Génotype Aviso (A) Express (E), Bloc 1, 3, 4, Traitement enrichi (N1) appauvri (N0), Rang R15 à R1



Annexe II : Teneur en oses solubles Génotype Aviso (A) Express (E), Traitement enrichi (N1) appauvri (N0), Rang R, gluc glucose, fruc fructose, sach saccharose.



Annexe III : Variabilité de la teneur en oses pariétaux selon le rang foliaire (R15 à R1) en condition enrichie en azote. Fuc,Fucose, Rha,Ramnose, Ara, Arabinose, Gal,Galactose, Glu,Glucose, Xyl,Xylose, Gal.A Acide Galaturonique, Glc.A, Acide glucuronique
Effet obtenus par tests Anova : *** hautement significatif, ** très significatif, * significatif, . non significatif.

	Rang	Variabilité			Valeur de Fischer et significativité		
		Min	Moy	Max	Effet de G	Effet de R	Effet de G*R
FUC	15	0.96	1.06	1.61	33.37 ***	17.53 ***	1.47
	10	1.06	1.36	1.66			
	8	1.11	1.49	1.87			
	5	1.65	2.23	2.81			
	3	1.65	2.37	3.08			
	1	2.58	3.21	3.83			
RHA	15	1.85	2.06	2.26	8.90 *	3.55 *	0.98
	10	2.01	2.20	2.39			
	8	2.04	2.20	2.37			
	5	2.25	2.68	3.10			
	3	2.48	2.86	3.12			
	1	2.65	3.63	4.60			
ARA	15	29.70	31.25	32.81	3.86	1.50	0.95
	10	29.04	29.29	29.54			
	8	26.90	29.53	32.17			
	5	29.09	30.44	31.79			
	3	26.58	27.64	28.69			
	1	27.02	27.54	28.05			
GAL	15	23.39	25.82	28.24	5.73 *	0.62	2.43
	10	21.72	25.54	29.37			
	8	24.62	25.04	25.47			
	5	25.02	25.46	25.90			
	3	23.10	23.32	23.54			
	1	23.27	24.78	26.30			
GLU	15	7.78	11.08	14.37	2.31	1.22	0.61
	10	15.28	16.31	17.33			
	8	12.46	17.67	22.88			
	5	9.92	12.69	15.45			
	3	7.37	11.75	16.41			
	1	5.28	6.67	8.06			
XYL	15	8.42	9.03	9.63	2.18	8.84 **	0.64
	10	8.40	8.55	8.70			
	8	8.12	8.65	9.17			
	5	9.72	11.37	13.02			
	3	11.13	11.92	12.72			
	1	14.92	15.19	15.45			
GALA	15	15.97	19.60	23.22	6.85 *	2.08	1.29
	10	13.47	16.46	19.46			
	8	13.94	15.20	16.46			
	5	13.90	14.83	15.77			
	3	17.88	19.39	20.90			
	1	17.31	18.06	18.81			
GLCA	15	0.07	0.11	0.15	38.38 ***	14.99 ***	4.78 *
	10	0.18	0.29	0.40			
	8	0.05	0.21	0.37			
	5	0.20	0.30	0.41			
	3	0.39	0.81	1.22			
	1	0.42	0.93	1.43			

Annexe III : Variabilité de la teneur en oses pariétaux selon le rang foliaire (R15 à R1) en condition enrichie en azote. Fuc,Fucose, Rha,Ramnose, Ara, Arabinose, Gal,Galactose, Glu,Glucose, Xyl,Xylose, Gal.A Acide Galaturonique, Glc.A, Acide glucuronique
Effet obtenus par tests Anova : *** hautement significatif, ** très significatif, * significatif, . non significatif.

	Rang	Variabilité			Valeur de Fischer et significativité		
		Min	Moy	Max	Effet de G	Effet de R	Effet de G*R
FUC	15	0.90	0.93	0.95	14.0 **	42.02 ***	6.93 **
	10	0.92	1.01	1.11			
	8	1.11	1.12	1.13			
	5	1.84	1.86	1.87			
	3	1.46	2.28	3.10			
	1	2.83	3.52	4.22			
RHA	15	1.37	1.72	2.07	56.75 ***	14.67 ***	3.31 *
	10	1.09	1.62	2.16			
	8	1.16	1.86	2.57			
	5	1.69	2.66	3.62			
	3	2.45	2.48	3.52			
	1	2.68	3.40	4.12			
ARA	15	28.78	29.97	31.16	9.46 **	0.90	0.62
	10	24.20	27.94	31.68			
	8	22.87	26.27	29.66			
	5	27.25	31.50	35.75			
	3	28.18	28.47	28.76			
	1	28.18	30.25	32.33			
GAL	15	21.45	25.85	30.25	20.10 ***	0.40	1.52
	10	18.60	24.65	30.69			
	8	18.86	23.27	27.68			
	5	22.35	26.66	30.96			
	3	25.02	25.07	25.12			
	1	24.60	25.74	26.88			
GLU	15	18.68	19.31	19.95	4.41	7.36 **	3.69 *
	10	15.07	22.65	30.23			
	8	15.61	24.70	33.79			
	5	8.28	10.39	12.50			
	3	9.06	14.29	19.51			
	1	4.04	5.31	6.57			
XYL	15	7.14	7.85	8.56	1.74	14.79 ***	3.26 *
	10	5.39	6.30	7.22			
	8	5.57	6.43	7.29			
	5	8.68	9.18	9.68			
	3	7.45	10.10	12.76			
	1	13.47	13.71	13.95			
GALA	15	8.46	14.16	19.86	4.90	0.10	0.51
	10	11.74	15.43	19.12			
	8	15.75	15.96	16.17			
	5	10.68	17.21	23.74			
	3	14.71	16.43	18.14			
	1	15.65	16.99	18.34			
GLCA	15	0.08	0.22	0.35	19.32 ***	5.92 **	1.52
	10	0.34	0.39	0.45			
	8	0.31	0.40	0.48			
	5	0.15	0.55	0.94			
	3	0.48	0.88	1.29			
	1	0.70	1.08	1.46			

Fiche de confidentialité et de diffusion du mémoire

Confidentialité

Non Oui si oui : 1 an 5 ans 10 ans

Pendant toute la durée de confidentialité, aucune diffusion du mémoire n'est possible (1).

Date et signature du maître de stage (2) :

A la fin de la période de confidentialité, sa diffusion est soumise aux règles ci-dessous (droits d'auteur et autorisation de diffusion par l'enseignant à renseigner).

Droits d'auteur

L'auteur(3) Nom Prénom -----

autorise la diffusion de son travail (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

Oui Non

Si oui, il autorise

la diffusion papier du mémoire uniquement(4)

la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

la diffusion papier et électronique du mémoire (joindre dans ce cas la fiche de conformité du mémoire numérique et le contrat de diffusion)

(Facultatif) accepte de placer son mémoire sous licence Creative commons CC-By-Nc-Nd (voir Guide du mémoire Chap 1.4 page 6)

Date et signature de l'auteur :

Autorisation de diffusion par le responsable de spécialisation ou son représentant

L'enseignant juge le mémoire de qualité suffisante pour être diffusé (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

Oui Non

Si non, seul le titre du mémoire apparaîtra dans les bases de données.

Si oui, il autorise

la diffusion papier du mémoire uniquement(4)

la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

la diffusion papier et électronique du mémoire

Date et signature de l'enseignant :

(1) L'administration, les enseignants et les différents services de documentation d'AGROCAMPUS OUEST s'engagent à respecter cette confidentialité.

(2) Signature et cachet de l'organisme

(3).Auteur = étudiant qui réalise son mémoire de fin d'études

(4) La référence bibliographique (= Nom de l'auteur, titre du mémoire, année de soutenance, diplôme, spécialité et spécialisation/Option)) sera signalée dans les bases de données documentaires sans le résumé

Annexe VII : Attestation de conformité de la version numérique du rapport vis-à-vis de l'original papier

Dépôt numérique de mémoire

ATTESTATION DE CONFORMITE DE LA VERSION NUMERIQUE

Je, soussigné(e),

Nom JACQUES

Prénom : Cécile

Ci-après désigné « l'Auteur »

Atteste que la version numérique de mon mémoire de fin d'études dans sa version définitive (incluant les corrections demandées par le jury de soutenance),

intitulé

Effets d'une carence en azote sur les modifications de la paroi lors du développement foliaire chez le colza

correspond à la version imprimée du document, déposé à la bibliothèque générale d'AGROCAMPUS OUEST (CFR de référence)

A LE PONDY,

le 09/07/2018

Signature

Dépôt numérique de mémoire
CONTRAT DE DIFFUSION NUMERIQUE DE MEMOIRE

Entre

AGROCAMPUS OUEST, Institut supérieur des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage dont le siège est basé 65 rue de Saint-Brieuc, 35042 RENNES, représenté par son Directeur Général, Grégoire THOMAS

et

L'auteur du mémoire :

Nom : JACQUES

Prénom : Cécile

Adresse personnelle : 2 rue Gaston Boutillon 18210 LE PONDY

Intitulé du mémoire : Effets d'une carence en azote sur les modifications de la paroi lors du développement foliaire chez le colza

Ci-après désigné auteur,

Article1

Le présent contrat ne concerne que les mémoires de fin d'études des cursus de formation d'AGROCAMPUS OUEST, déposés suite à la soutenance dans leur version validée par le jury. La diffusion de ces mémoires est conditionnée au visa du responsable de spécialisation/ option, garantissant la prise en compte de l'avis du jury.

Article2

L'auteur autorise AGROCAMPUS OUEST à diffuser le mémoire sur le site Internet de l'établissement ou sur les plateformes choisies par AGROCAMPUS OUEST en conformité avec la fiche de diffusion correspondante. Le présent contrat a pour objet de permettre à AGROCAMPUS OUEST de diffuser le mémoire dans le respect des droits de propriété intellectuelle de son auteur.

Le présent contrat n'implique pas l'obligation pour AGROCAMPUS OUEST de faire usage de l'autorisation qui lui est donnée. La diffusion effective, tout comme son éventuelle suppression, n'implique en aucun cas une appréciation au bénéfice de l'auteur ou des tiers et n'est pas source de responsabilité à l'égard des tiers.

Article3

L'auteur demeure responsable du contenu de son œuvre. L'auteur garantit à AGROCAMPUS OUEST qu'il détient tous les droits nécessaires à la diffusion de son œuvre, en particulier les autorisations écrites des titulaires des droits sur les œuvres reproduites, partiellement ou intégralement. En cas de non respect de cette clause,

AGROCAMPUS OUEST se réserve le droit de refuser, suspendre ou arrêter la diffusion des parties du mémoire intégrant des documents ou parties de documents pour lesquels les droits de reproduction et de représentation n'auraient pas été acquis.

AGROCAMPUS OUEST ne pourra être tenu responsable de représentations illégales de documents, pour lesquels l'auteur n'aurait pas signalé qu'il n'en avait pas acquis les droits.

Article4

L'auteur pourra à tout moment retirer l'autorisation de diffusion qu'il accorde par le présent contrat. Pour cela, il devra en aviser formellement AGROCAMPUS OUEST par lettre recommandée avec accusé de réception. AGROCAMPUS OUEST aura alors l'obligation de retirer l'œuvre lors de la plus prochaine actualisation du site de l'établissement et du portail documentaire.

Article5

L'auteur autorise AGROCAMPUS OUEST à procéder, le cas échéant, au reformatage de son mémoire en vue de l'archivage, de la diffusion ou de la communication dans le respect des autorisations de diffusion définies par lui précédemment.

Article6

Les autorisations de diffusion données à AGROCAMPUS OUEST n'ont aucun caractère exclusif et l'auteur conserve toutes les autres possibilités de diffusion de son mémoire.

Article7

L'auteur autorise, à titre gracieux, la cession des droits de diffusion, concernant le mémoire qui lui appartient. Cette autorisation, dans la durée maximale définie par le droit patrimonial, est strictement réservée à la diffusion du mémoire à des fins pédagogiques et de recherche.

Fait à LE PONDY , le 09/07/2018

Pour AGROCAMPUS OUEST,
L'auteur,
Pour Le Directeur Général
Et par délégation,



Diplôme et Mention : Master Biologie, Agrosciences
Parcours : Amélioration, Production et Valorisation du Végétal
Option : Physiologie moléculaire et adaptation aux stress
Responsable d'option : Gravot Antoine

Auteur(s) : Jacques Cécile

Date de naissance* : 09/07/1995

Nb pages : 24

Annexe(s) : 4

Année de soutenance : 2018

Organisme d'accueil : Biopi

Adresse : Rue baudelocq

90 000 Amiens

Maître de stage : Pau-Roblot Corinne

Domon Jean-Marc

Titre français : Effets d'une carence en azote sur les modifications de la paroi lors du développement foliaire chez le colza.

Titre anglais: Effects of nitrogen deficiency on wall changes during foliar development in rapeseed

La sénescence végétative est une étape cruciale pour la remobilisation d'azote, ce qui permet de redistribuer les macronutriments notamment vers le grain et ainsi obtenir un rendement optimal. Le colza est une culture présentant une importance économique mais demandant une fertilisation azotée importante. Il est donc important de mieux comprendre les phénomènes de remobilisation afin de limiter les pertes de cet élément primordial lors de la sénescence foliaire. Cette étude met en avant l'impact de l'azote sur la paroi cellulaire des feuilles lors du développement, et pendant leurs sénescences. Pour cela 2 génotypes ont été utilisés Aviso (peu sensible au manque d'azote) et Express (sensible).

L'activité des enzymes modifiant la paroi (PGs, PME) augmentent tout au long du vieillissement des feuilles. Malgré des différences d'activité entre Aviso et Express, l'appauvrissement en azote n'amène que peu de variation dans cette évolution. L'augmentation de ces activités coïncide bien avec le fait que lors du vieillissement des feuilles on note une baisse de la cohésion cellulaire.

Des différences de composition en oses mineures de la paroi entre les différents rangs foliaires ont été observées. Différences plus marquées en condition appauvrie en azote avec Express ce qui pourrait expliquer la sensibilité de ce génotype au manque d'azote. Les modifications que l'on retrouve au niveau des chaînes latérales des pectines (RG I et II) et des hémicelluloses (Xyloglucanes et Hétéroxylanes) entraînant des changements d'organisation de ces composés au sein de la paroi.

Vegetative senescence is a crucial step to nitrogen remobilization, this allows to redistribute macroelements to seed and thus to obtain an optimal yield. Rape oilseed is an important economic crop but need a wild nitrogen fertilization. Thus, it is important to understand remobilization phenomena to limit the lose of this primordial element during leaf senescence. This study underlines the nitrogen impact on leaves cell wall during development, and their senescence. For these 2 genotypes had been used Aviso (nitrogen deficiency tolerant) and Express (sensible).

Cell wall modifying enzymes activity (PGs, PME) rise during aging. Despite activity differences between Aviso and Express, the exhaustion of nitrogen not disturb this evolution. Rise of these activities agree with the cellular cohesion diminution during aging for leaves.

Differences in minor cell wall sugar composition between leaf rank had been observed. These differences are most important for Express in lack of nitrogen, this could explain the sensitivity of this genotype. Modifications observed in pectic lateral chain (RG I and II) and hemicellulose (xyloglucan, heteroxylan) induce organization modification of these compounds in cell wall.

Mots-clés : colza, feuille, senescence, enzymes de modifications de la paroi, degré de méthylation, oses pariétaux et solubles

Key Words: rape oilseed, leaf, senescence, modifying enzymes, methylation degree, cell wall and soluble sugar