

ÉCOLE DOCTORALE VENAM

Année 2013

Place de l'azote dans l'interaction plante - plante parasite :
Brassica napus L. – *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie et Agronomie

Spécialité : Physiologie végétale

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Zachary GAUDIN

Le 11 octobre 2013, devant le jury ci-dessous

Président M. Jean-Christophe AVICE, Professeur, Université de Caen Basse-Normandie
Rapporteurs M. Guillaume TCHERKEZ, Professeur, Université Paris-Sud
M. Jean-Christophe AVICE, Professeur, Université de Caen Basse-Normandie
Examineurs M. Philippe SIMIER, Professeur, Université de Nantes
M. Jean-Bernard POUVREAU, Maître de Conférences, Université de Nantes

Directeur de thèse : M. Philippe SIMIER

Co-encadrant de thèse : M. Jean-Bernard POUVREAU

Avant d'adopter un phrasé plus rigoureux et d'entrer proprement dit dans ce manuscrit, je souhaite effectuer bon nombre de remerciements.

Tout d'abord, je tiens à remercier les rapporteurs, Guillaume Tcherckez et Jean-Christophe Avice, d'avoir accepté de mettre à contribution leur expertise afin d'évaluer le travail présenté dans ce manuscrit.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux deux directeurs du LBPV, Philippe Simier et Philippe Delavault, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse accompagnée de quatre ans d'enseignement. Je souhaite de plus vous remercier de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer deux congrès internationaux à l'étranger (Italie et Japon) ainsi que des congrès français, qui m'ont permis, d'une part de rencontrer certaines personnalités du monde des plantes parasites, mais également d'effectuer mes premières armes en communication scientifique.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse, Alain Bouchereau, Richard Robins et Anis Limami, pour m'avoir orienté et évalué quand il le fallait, afin de me donner du recul et me permettre d'avancer.

Je souhaite remercier tout particulièrement mon directeur de thèse, Philippe Simier alias Phi.S, et mon co-encadrant de thèse, Jean-Bernard Pouvreau alias JB. Je leur dois beaucoup, et même plus encore, mais la plus grande découverte qu'ils m'ont permis de réaliser restera celle de l'absolue nécessité d'être muni, d'(au moins) un second cerveau, fonctionnant en synergie avec le premier, afin d'analyser, comparer, intégrer, retenir, manipuler, organiser, apprendre, enseigner, rédiger, expliquer... sans en oublier pour autant sa vie privée. Philippe, merci à toi pour les nombreuses heures passées à m'expliquer ou me montrer ce qu'est une réflexion scientifique et ce que signifie le mot "intégratif". Sans tes corrections, ce manuscrit n'aurait pas été le même. JB, merci à toi pour l'apprentissage technique et réflexif plus que conséquent que tu m'as apporté au jour le jour. Mais te rends-tu compte de la difficulté, pour un cerveau non-exercé, de suivre tes raisonnements ultra-rapides (d'où ta vitesse d'élocution cela va sans dire) ? Merci à vous de m'avoir fait confiance tout au long de ces quatre ans et de m'avoir permis de réaliser cette thèse avec une certaine liberté d'action. Ces quatre années furent pour moi réellement enrichissantes et chargées d'innombrables acquis, constituant maintenant je l'espère une base solide pour l'avenir.

Merci à tous ceux qui ont partagé avec moi le bureau des "jeunes". Aux anciens, Thomas alias 'Jean-Jean' pour cet image du chercheur passionné adepte du travail en "sous-marin" et pour tes sarcasmes toujours présents ; Mathieu, pour ta bonne humeur permanente initiatrice de l'ambiance de ce bureau ; Marie, pour les innombrables "coups de main" que tu as pu m'apporter durant les sorties terrains et pour m'avoir montré que tout est possible (même avoir une vie après la recherche) ; Marco, pour ta rapidité d'action (c'est peu dire) et la quantité de choses que tu m'as appris "l'air de rien" ; Ines, pour ta gentillesse permanente et tes bons petites plats ; mais aussi à tous les autres thésards, assistant-ingénieurs, techniciens, stagiaires qui sont passés par le LBPV ; Antoine, Glenn, Delphine, Mathieu alias Francis, Elsa, Natacha, Aude, Thomas, Guillaume alias Michou, sans oublié bien sur tous ceux que j'ai omis..!

Merci à Greg, Marie, Thomas, Mathieu, Michou et JB pour les nombreuses soirées où nous n'avons pas parlé que de science, mais plutôt développé notre amitié !

Merci à Christian, pour les heures de parlote, les cargaisons de succulents champignons, les coups de main de dépotage, et pour les sorties botaniques dont je remercie d'ailleurs toute l'équipe (Pascal, Vona, JB et Raphael) pour m'avoir montré cet autre côté de l'enseignement.

Un grand merci à Phi. S., JB et Marie pour leur soutien et leur aide durant les nombreuses sorties terrains et les heures de phénotypage qui en ont découlé. "Ah bon, tu n'as trouvé personne pour t'emmener dans un champ de colza Vendéen en plein mois de décembre et t'aider à échantillonner quelques sacs poubelles des systèmes racinaires ? Bizarre..!"

Je souhaite remercier Phi. S, Phi. D., Mathieu, JB et Vaness' pour les bons moments passés durant les congrès à l'étranger, et pas forcément focalisés sur la science comme nous pourrions le croire !

Merci à Johannes, Sabine, Dominique et Natacha pour l'aide technique (et bien d'autres choses) que vous m'avez apporté tant au niveau du maintien des cultures que du déroulement des travaux pratiques.

Durant ma thèse, j'ai également été amené à rencontrer et à travailler avec des gens que je souhaite remercier :

- Nadia, Ingrid, Illa et Richard (CEISAM), sans qui la partie SMRI de ces travaux n'aurait pas été possible
- Karine et Emmanuelle (LABERCA) pour la première approche d'un XEVO et les heures de "prise de tête" technique qui en ont découlées, mais également pour la mise à disposition d'une GC-MS et le soutien technique associé.
- Solenne (Université de Rennes et de l'INRA du Rheu) pour les analyses GC-FID
- Nathalie (Plateforme P₂M₂) pour la qualité de ton enseignement qui m'a permis d'apprendre à utiliser une "grosse machine" UPLC-PDA-ESI-MS/MS.

J'en profite d'ailleurs pour remercier tout particulièrement Alain Bouchereau pour m'avoir permis d'effectuer de nombreuses analyses au sein de la plateforme P₂M₂, mais également l'ensemble de l'équipe Rennaise qui m'a offert un accueil des plus chaleureux (et c'est peu dire) durant les nombreux mois que j'ai passé là-bas.

Un grand merci à bon nombre de mes ami(e)s, qui se reconnaîtront, pour avoir conservé un œil assez circonspect face à mes travaux mais toujours curieux et bienveillant du fait de l'importance que cela semblait incarner à mes yeux. Merci également à mes ami(e)s thésard(e)s, Marie, Kévin, Dany, Loulou, Alex et bien d'autres, pour leur soutien et les échanges de points de vue. Enfin, un grand merci à Julien pour l'aide inestimable qu'il m'a apporté dans cette lutte difficile contre Word, et le soutien moral qu'il m'a offert durant ce moment difficile.

Je tiens à remercier chaleureusement mes parents et ma famille pour le soutien inflexible qu'ils m'ont apporté durant toutes ces années d'études et de thèse, mais surtout pour avoir su éveiller et maintenir en moi un goût certain pour l'apprentissage et les savoirs, et pour m'avoir ouvert les yeux, durant mon enfance, sur les merveilles de la nature et du fonctionnement des êtres vivants.

Et enfin, merci à toi, Kinsy, pour toutes ces années passées et à venir, malgré l'éloignement géographique, malgré les sautes d'humeurs inhérentes aux aléas d'obtention de résultats, malgré le perfectionnisme (maniaquerie ?) que j'ai ramené avec moi à la maison "à mon insu". Merci pour ton soutien moral, toujours présent et bénéfique, sans lequel il m'aurait été difficile d'avancer comme je l'ai fait.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	7
1 LE MONDE DES PLANTES PARASITES	9
1.1 Généralités concernant les plantes parasites.....	9
1.2 Les genres <i>Orobanche</i> et <i>Phelipanche</i>	13
1.3 <i>Phelipanche ramosa</i> (L.) Pomel, dite l'orobanche rameuse	15
1.4 Mécanismes d'évitement et de résistance à l'orobanche	37
2 LE COLZA (<i>BRASSICA NAPUS</i> L.), ESPECE D'INTERET AGRONOMIQUE	51
2.1 Généralités.....	51
2.2 Métabolisme azoté chez les plantes.....	67
2.2.1 Mécanismes de perception et d'absorption	69
2.2.2 Assimilation et transport de l'azote	87
2.2.3 Schéma d'utilisation de l'azote chez le colza	101
2.2.4 Remobilisation de l'azote.....	107
3 INTERACTION <i>BRASSICA NAPUS</i> / <i>PHELIPANCHE RAMOSA</i>	117
3.1 Situation française et européenne	117
3.2 Description de l'interaction <i>Phelipanche ramosa</i> / <i>Brassica napus</i>	121
3.3 Particularité de l'interaction <i>Phelipanche ramosa</i> / <i>Brassica napus</i>	123
OBJECTIFS ET STRATEGIES DE RECHERCHE	129
CHAPITRE 1 IMPACT DE LA FERTILISATION AZOTEE, SOUFREE ET PHOSPHATEE SUR LA SENSIBILITE DE BRASSICA NAPUS A PHELIPANCHE RAMOSA	137
1 MATERIELS ET METHODES	139
1.1 Matériel végétal.....	139
1.2 Conditions de culture	141
1.3 Analyses biochimiques	143
2 RÉSULTATS.....	149
2.1 A high-throughput seed germination assay for parasitic plants.....	149
2.1.1 Abstract	149
2.1.2 Background	151
2.1.3 Results.....	153
2.1.4 Discussion	163
2.1.5 Conclusions	165
2.1.6 Methods.....	165
2.2 Impact des différents régimes de fertilisation	173
3 DISCUSSION	181
CHAPITRE 2 : ABSORPTION, TRANSLOCATION ET FLUX D'AZOTE DANS L'INTERACTION BRASSICA NAPUS / PHELIPANCHE RAMOSA	193
1 MATERIELS ET METHODES	195
1.1 Matériel végétal.....	195
1.2 Analyse par spectrométrie de masse de rapport isotopique (SMRI).....	199
1.3 Analyse complémentaire : mesure de la capacité enzymatique Nitrate Réductase in vitro	205
2 RESULTATS.....	209

2.1	Absorption, translocation et flux d'azote dans l'interaction entre un génotype de colza très sensible (var. ES Alienor) et l'orobanche rameuse	209
2.2	Dynamique de l'azote dans l'interaction suivie par traçage isotopique ($^{15}\text{NO}_3^-$).....	215
2.3	Impact du génotype de colza sur l'interaction	217
3	DISCUSSION	223
CHAPITRE 3 : CARACTERISATION METABOLOMIQUE DE L'INTERACTION <i>B. NAPUS</i> / <i>P. RAMOSA</i>		231
1	MATERIELS ET METHODES	233
1.1	Matériel végétal.....	233
1.2	Analyses métabolomiques.....	235
2	RESULTATS.....	241
2.1	Analyse des pools d'acides aminés des différents organes du colza (variété ES Alienor) et de l'orobanche rameuse	241
2.1.1	Caractérisation des pools d'acides aminés libres du colza	241
2.1.2	Métabolomique des exsudats phloémiens foliaires du colza (variété ES Alienor).....	247
2.1.3	Métabolomique de l'orobanche rameuse.....	251
2.2	Rapid and robust method for investigating nitrogen metabolism of ^{15}N labeled amino acids using AccQ•Tag UPLC-PDA-ESI-MS. Application to a parasitic plant - plant interaction.	257
2.2.1	Introduction	257
2.2.2	Experimental Section	259
2.2.3	Results and Discussion	265
2.2.4	Conclusions	275
2.3	Résultats complémentaires	281
3	DISCUSSION	283
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES MAJEURES.....		293
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		303
ANNEXES.....		413
Liste des tableaux.....		421
Liste des figures		423
Liste des abréviations.....		431

Introduction générale



Figure 1 : Interaction *Brassica napus* / *Phelipanche ramosa*

A : parcelle de colza infestée (Saint-Martin de Fraigneau, Vendée)

B : fleur d'orobanche rameuse

C : jeune hampe florale d'orobanche rameuse

D : racines d'un pied de colza parasité par l'orobanche rameuse

En comparaison du règne animal, le règne végétal est essentiellement caractérisé par la présence de plastides, organites cellulaires sites des mécanismes photosynthétiques permettant l'élaboration de molécules organiques à partir d'éléments inorganiques (CO₂, H₂O, lumière, sels minéraux) et conférant aux plantes leur caractère autotrophe. De façon peu fréquente au cours de l'évolution, certains spermatophytes ont perdu leur autotrophie au profit d'un mode de vie parasitaire, devenant ainsi hétérotrophe vis-à-vis des photoassimilats produits par d'autres plantes supérieures, dites plantes hôtes. Selon leur niveau d'hétérotrophie, on distingue les plantes hémiparasites, chlorophylliennes et photosynthétiques, ainsi en partie autonomes, des plantes holoparasites achlorophylliennes entièrement tributaires de leur hôte pour leur nutrition organique. Les relations trophiques développées au sein de ce type d'interaction plante - plante peuvent se révéler dommageables pour la plante hôte, le parasite se développant au détriment de la plante nourricière à des degrés variables allant d'un coût trophique négligeable à la mort de l'hôte. Certaines espèces parasites ont adopté un mode de vie adventice des agrosystèmes devenant très agressives vis-à-vis de la culture hôte. Dans ces conditions, lutter contre ces infestations devient un réel enjeu agro-économique. C'est pourquoi certaines adventices parasites sont considérées comme des phytopathogènes à part entière.

L'étude des interactions plantes hôtes - plantes parasites est "la raison d'être" du LBPV (Laboratoire de Biologie et Pathologie Végétales) depuis sa création en 1962. Bien que le spectre d'investigation fût longtemps assez large, les principales thématiques de recherche du laboratoire sont aujourd'hui focalisées sur l'étude des plantes parasites de la famille des *Orobanchaceae* et plus particulièrement de l'orobanche rameuse (*Phelipanche ramosa*), phytopathogène polyphage devenu problématique en France, notamment pour la culture du colza (*Brassica napus* ; **Fig. 1**). L'étude des mécanismes biologiques impliqués dans la mise en place et le développement de cette interaction est un des passages obligatoires à toute tentative de lutte ciblée. En effet, toute particularité développementale ou métabolique du parasite pourrait être considérée comme une source de vulnérabilité potentiellement exploitable.

Le colza est une plante de grandes cultures, cultivée dans le monde entier et particulièrement en Europe, pour la forte teneur en huile de ses graines. Sa culture est devenue plus difficile dans certaines régions de France (en Poitou-Charentes et en Vendée principalement), où l'orobanche rameuse s'est accommodée à ce type d'agrosystème. Les infestations d'orobanche menacent très sérieusement la durabilité de la culture de colza d'hiver dans ces territoires où des solutions de substitutions sont difficilement envisageables. De plus, la fertilisation azotée tient une place majeure dans la productivité de cette culture, à cause notamment de la faible efficacité d'utilisation de l'azote caractérisant le colza. En considérant les directives actuelles d'une réduction des intrants (phytosanitaires et fertilisants, plan Ecophyto 2018 et Grenelles de l'Environnement), il est important de poser la question de l'impact d'itinéraires culturaux innovants et de cultures associées peu usuelles sur l'infestation du colza par l'orobanche rameuse. Ce travail de thèse s'inscrit donc dans cette réflexion et vise pour cela à élucider le rôle de l'azote au sein de l'interaction *Brassica napus* / *Phelipanche ramosa*. Les travaux présentés dans ce manuscrit s'articulent autour de deux facettes bien distinctes du rôle de ce nutriment dans l'interaction. Mes investigations se sont tout d'abord

portées sur l'évaluation de l'effet de la fertilisation azotée (mais aussi soufrée et phosphatée) sur le degré de sensibilité du colza à l'orobanche, d'une part en caractérisant la capacité d'exsudats racinaires obtenus en cultures hydroponiques à stimuler la germination de graines d'orobanche, et d'autre part grâce à la mise au point d'un système de co-culture en mini-rhizotron approprié à l'observation des phases de développement souterrain du parasite (germination des graines et fixation aux racines hôtes). Dans un second temps, via une démarche de traçage isotopique ^{15}N couplée au profilage des métabolites primaires, mes travaux ont visé à une analyse approfondie des flux d'azote globaux au sein de l'interaction, à l'identification des composés transférés du colza vers l'orobanche et à une caractérisation des voies d'utilisation de ces composés par le parasite. De ce fait, ces travaux ont nécessité un développement méthodologique relativement important, que ce soit pour l'évaluation rapide du taux de germination des graines d'orobanche par une approche haut débit, ou pour l'analyse des isotopologues ^{15}N d'acides aminés par UPLC-PDA-ESI-MS.

Le programme de doctorat présenté dans ce manuscrit a été financé en partie par une allocation de recherche MESR, intégré à l'École Doctorale Végétal, Environnement, Nutrition, Agro-alimentaire et Mer (VENAM). Il a débuté le 1er octobre 2009 et a été réalisée au sein du LBPV (EA 1157, Université de Nantes, SFR 4207 QUASAV) sous la direction de Philippe Simier et l'encadrement de Jean-Bernard Pouvreau.

Ce manuscrit est introduit par une synthèse bibliographique qui devrait permettre au lecteur de disposer de tous les éléments nécessaires à la compréhension des enjeux agro-économiques et biologiques, ainsi que de l'intérêt scientifique de ce travail de thèse, mais également d'acquérir une vue d'ensemble des recherches récentes susceptibles de favoriser l'appréciation des résultats de ce travail. L'investigation bibliographique est axée, dans un premier temps, autour des plantes parasites et plus particulièrement de l'orobanche rameuse. Puis une présentation du colza comme plante d'intérêt agronomique ouvrira la porte à une synthèse du schéma d'utilisation de l'azote chez cette espèce, pour enfin décrire l'état de l'art actuel concernant l'interaction colza - orobanche rameuse.

Étude bibliographique

Hemiparasite		Holoparasite
Facultative		Obligat
	Orobanchaceae (r; 90/1800)	<i>Cuscuta</i> (s; 1/145)
		Lennoaceae (r; 2/5)
		Mitrastemonaceae (r; 1/2)
Santalales (r, s; 149/2101–2114)		Balanophoraceae (r; 17/43–44)
		Rafflesiaceae (e; 3/19)
		Apodanthaceae (e; 3/23)
Krameriaceae (r; 1/18)		Cytinaceae (r; 2/7–11)
		Cynomoriaceae (r; 1/2)
	<i>Cassytha</i> (s; 1/16)	Hydnoraceae (r; 2/15–18)

Figure 2 : Diversité des angiospermes parasites (Westwood *et al.*, 2010)
 Mode de fixation : r, épiphize ; s, épiphyte ; e, principalement endophytes internes
 x/y : nombre de genres et d'espèces estimés

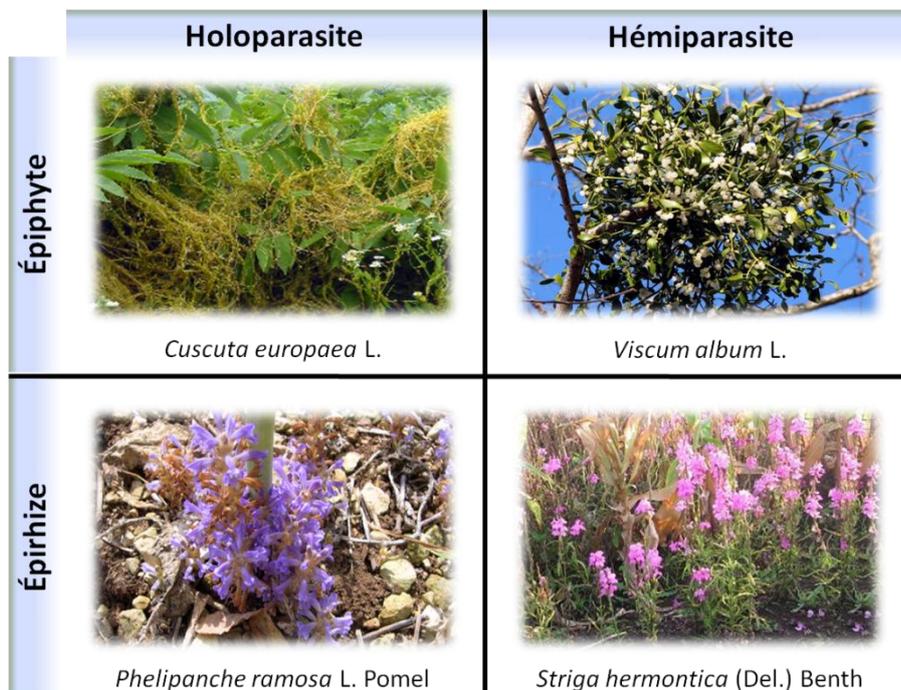


Figure 3 : Illustration classique des différents types d'angiospermes parasites

1 Le monde des plantes parasites

1.1. Généralités concernant les plantes parasites

Le mode de vie parasitaire d'un petit nombre de plantes reste à l'heure actuelle peu connu du grand public de par l'originalité et la rareté de ces représentants. En effet, on dénombre quelques 4200 espèces de plantes parasites (environ 1% des Angiospermes) taxonomiquement et biogéographiquement largement distribuées, puisqu'elles représentent 22 familles et 273 genres répartis de l'arctique aux tropiques (**Fig. 2** ; Nickrent *et al.*, 1998 ; Westwood *et al.*, 2010). Ce caractère trophique original semble être apparu au moins 12 ou 13 fois, de manières indépendantes, au cours de l'évolution (Barkman *et al.*, 2007 ; Westwood *et al.*, 2010). Mis à part *Parasitaxus ustus* (*Podocarpaceae*), seul représentant du clade des gymnospermes au sein du monde des plantes parasites (Feild and Brodribb, 2005), l'intégralité des espèces connues appartient à la classe des Dicotylédones. Nous parlerons donc plus largement d'angiospermes parasites.

On subdivise généralement le monde des plantes parasites en fonction du site de fixation du parasite sur l'hôte (**Fig. 3**, organe de fixation : suçoir). En effet, on distingue les parasites de tige ou **épiphytes** (*Viscaceae*, *Convolvulaceae*, *Lauraceae*, *Loranthaceae*...), des parasites de racine ou **épirhizes** (*Orobanchaceae*, *Hydnoraceae*, *Balanophoraceae*, *Rafflesiaceae*...). Un second degré de classification des plantes parasites s'effectue en fonction de leur niveau de dépendance trophique vis-à-vis de leur hôte. On différencie tout d'abord les parasites **facultatifs** des parasites **obligatoires**, de par la capacité ou l'incapacité de ces derniers à achever leur cycle de vie indépendamment de celui de leur hôte. Une seconde dichotomie, moins tranchée cette fois-ci, permet de différencier les **holoparasites**, non ou très peu chlorophylliens, qui prélèvent tous les nutriments (carbone et azote réduits) nécessaires à leur croissance chez la plante hôte via des connexions majoritairement phloémiennes, des **hémiparasites**, chlorophylliens, censés limiter leur prélèvement à l'eau et les sels minéraux présents dans le xylème de leur hôte, et donc capables de subvenir, au moins en partie, à leurs besoins nutritionnels de façon autotrophe. On parle alors de "phloem-feeders" et "xylem-feeders", respectivement.

Toutefois, il n'existe pas de frontière stricte entre ces deux groupes physiologiques. On sait par exemple que les *Cuscutes* contiennent de la chlorophylle et peuvent, dans certaines conditions, effectuer une photosynthèse d'appoint (Birschwilks, 2006), ou que les *Striga* spp. commencent leur développement à l'état d'holoparasites souterrains et le poursuivent ensuite sous forme d'une tige chlorophyllienne. Des travaux sur l'ultrastructure des suçoirs (cf. § ci-après) ont également montré que l'absence ou la présence de phloème dans ces organes ne coïncidait pas avec la répartition héli/holoparasites. En effet, des structures aptes à prélever et mettre en réserve des molécules organiques existent chez des parasites chlorophylliens, bien qu'à l'inverse, des jonctions xylémiennes aient été mise en évidence chez des holoparasites (Ozenda and Capdebon, 1979; Press and Graves, 1995; Hibberd and Jeschke, 2001).

Les plantes mycohétérotrophes, comme *Monotropa* spp., bien qu'achlorophylliennes, n'appartiennent pas au groupe des angiospermes parasites *sensu stricto*. En effet, elles sont impliquées dans une interaction tripartite par le biais d'un champignon mycorhizien par qui elles prélèvent indirectement les nutriments provenant d'une plante autotrophe (la plupart du temps des arbres). La principale caractéristique commune à l'ensemble des plantes parasites est une fixation directe sur une autre plante, dite hôte, via un appareil parasitaire endophytique spécialisé nommé haustorium (du latin *haurire* boire). Cet haustorium correspond à une sorte de racine modifiée qui forme un pont morphologique et physiologique entre le parasite et son hôte, et permet l'établissement d'une jonction entre le système vasculaire de l'hôte et celui du parasite, rendant possible le prélèvement des ressources nutritives nécessaires au développement de l'organisme hétérotrophe. D'une façon générale, un haustorium est constitué d'une partie externe élargie, nommée "sole adhésive" permettant l'adhésion sur un organe (racine ou tige) de l'hôte, et d'une partie contenue à l'intérieur de cet organe nommée "endophyte" ayant une fonction absorbante dite "de suçoir" (Kuijt, 1977 ; Ozenda and Capdebon, 1979). L'apparition de l'haustorium invasif chez les plantes fut l'évènement évolutif clef qui permit la transition vers le mode de vie parasitaire (Westwood *et al.*, 2010). On distingue alors les haustoria latéraux des haustoria terminaux ou primaires. Les premiers, caractéristiques des hémiparasites et des parasites facultatifs (cas des genres *Tryphisaria* et *Rhinantus* notamment), se développent sur le côté des racines de la plante parasite en contact avec celles d'une plante hôte. Leur développement n'altérant que temporairement la croissance du méristème racinaire, il est donc fréquent de trouver plusieurs haustoria latéraux sur une seule racine du parasite. Les seconds sont, quant à eux, caractéristiques des holoparasites (cas des genres *Orobanche* ou *Striga* notamment) et se développent à l'apex de la radicule peu de temps après la germination. De leur fixation et de l'établissement de connections vasculaires dépend le développement d'une tige ou d'un tubercule qui donnera naissance à la structure aérienne de la plante. Ce type d'holoparasite peut toutefois former, de façon spatio-temporellement secondaire, des haustoria latéraux. La mise en place d'haustoria terminaux apparaît comme étant l'évènement évolutif clef du développement des holoparasites, stade le plus évolué du parasitisme végétal, bien qu'il soit également commun à quelques hémiparasites telles que le gui.

Même si la grande majorité des angiospermes parasites ne représente que des curiosités botaniques adaptées à leurs niches écologiques, un certain nombre d'entre-elles sont considérées comme des phytopathogènes destructeurs, du fait des dommages et pertes de rendement qu'elles provoquent au sein de cultures d'intérêt agronomiques. Les genres *Arceuthobium* et *Viscum* (*Viscaceae*) provoquent des dégâts pouvant être importants (nanisme, croissance faible, sensibilité accrue aux pathogènes et aux insectes...) chez certaines espèces d'arbres (conifères et peupliers, respectivement). On a estimé par exemple qu'en 2003, 50 % des forêts de l'Ouest des USA étaient infestées par *Arceuthobium* spp., et qu'une infestation sévère peut provoquer jusqu'à 65 % de diminution de la croissance des arbres (Hawksworth *et al.*, 1996; Aly, 2007). Le genre *Cuscuta* (*Convolvulaceae*) induit des pertes de rendement chez un grand nombre de plantes cultivées (fourrages, légumineuses, vigne, café... ; Aly *et al.*, 2003). Les genres *Striga*, *Alectra*, *Orobanche* et *Phelipanche* (*Orobanchaceae*) représentent les plantes parasites ayant les conséquences agro-économiques les plus désastreuses. Prenons le cas de *Striga*, la bien nommée "herbe de sorcière", dont 3 espèces constituent actuellement un fléau

en Asie du Sud-Est, en Inde et plus insidieusement en Afrique, où plus de 40 % des terres arables sub-sahariennes sont infestées par une ou plusieurs espèces de *Striga*. Ce phytopathogène parasite majoritairement des *Poaceae* utilisées comme cultures vivrières (sorgho, millet, maïs, canne à sucre, patate douce...) et inflige des pertes de rendement allant de 30 à 90 %. *Striga* ssp. est une réelle "calamité" agro-économique puisqu'elle affecte la vie de plus de 100 millions de personnes à l'heure actuelle (Scholes and Press, 2008). Face à cela, quelques espèces de plantes parasites sont au contraire commercialisées. C'est le cas de *Santalum album* (*Santalaceae*) cultivé intensivement pour son bois ou ses propriétés odoriférantes et médicales (encens, huiles essentielles) (Giriram *et al.*, 2006).

1.2. Les genres *Orobanche* et *Phelipanche*

Le nom latin *Orobanche* dérive du Grec *orobos* la vesce et *ancho* étrangler, en référence à l'impact de ce parasite sur son hôte, fait connu depuis l'Antiquité pour certaines espèces. D'un point de vue systématique, la famille des *Orobanchaceae sensu lato*, anciennement apparentées aux *Scrophulariaceae*, est un groupe monophylétique regroupant 2060 espèces (90 genres). Elle est exclusivement constituée de plantes parasites à l'exception du genre *Lindenbergia* (Young *et al.*, 1999 ; Olmstead *et al.*, 2001). Le mode de vie parasitaire aurait une origine unique, et proviendrait de Laurasie, au Nord de l'océan Tethys (probablement à l'Est de l'Asie) au milieu de l'ère Tertiaire (limite Eocène-Oligocène ; Wolfe *et al.*, 2005). Des études phylogénétiques récentes, basées sur l'association de plusieurs marqueurs moléculaires, proposent une distribution en 6 clades majeurs au sein desquels la transition de l'hémiparasitisme vers l'holoparasitisme serait survenue 3 fois, de façon indépendante (Bennett and Mathews, 2006 ; McNeal *et al.*, 2013). La tribu des *Orobancheae sensu stricto* est composée d'environ 170 espèces holoparasites herbacées des régions tempérées à subtropicales, principalement dans l'hémisphère nord. Une certaine confusion règne quant à la classification des différentes espèces de cette tribu du fait de la réduction drastique, induite par le mode de vie holoparasitaire, du nombre de caractères phénotypiques classiquement utilisés pour l'identification taxonomique. Ces espèces étaient traditionnellement regroupées en 4 sections (*Trionychnon* Wallr., *Myzorrhiza* (Philippi), *Gymnocaulis* Nutt. et *Osproleon* Wallr. (= *Orobanche sensu stricto*). Les classifications basées sur des critères morphologiques, tels que la morphologie et l'ornementation des graines, la présence et la nature des bractéoles à la base du calice, les caractéristiques du calice ou caryologiques, ont amené plusieurs auteurs à identifier de façons différentes des genres séparés (Holub, 1990 ; Teryokhin *et al.*, 1993 ; Teryokhin, 1997 ; Plaza, 2004). Plus récemment, l'utilisation de séquences plastidiales et de séquences ITS nucléaires ont permis de regrouper les 4 sections en 2 genres phylogénétiquement distincts : le genre *Orobanche* (19 chromosomes) regroupant la section *Osproleon* et le genre *Diphelypaea*, et le genre *Phelipanche* (12 chromosomes) regroupant les sections *Gymnocaulis*, *Myzorrhiza* et *Trionychnon* (Schneeweiss *et al.*, 2004b,a ; Manen *et al.*, 2004 ; Park *et al.*, 2007 ; Joel, 2009). Cette dichotomie est également appuyée par des travaux basés sur l'étude de retrotransposons et de séquences d'ADN répétitives (Piednoël *et al.*, 2012, 2013). Il en découle un certain flottement qu'en a la mise en place du nom de genre *Phelipanche* face à des espèces depuis longtemps nommées *Orobanche* (*P. ramosa*, *P. aegyptiaca*, *P. mutelii*...). Quoi qu'il en soit, la phylogénie n'est pas une science

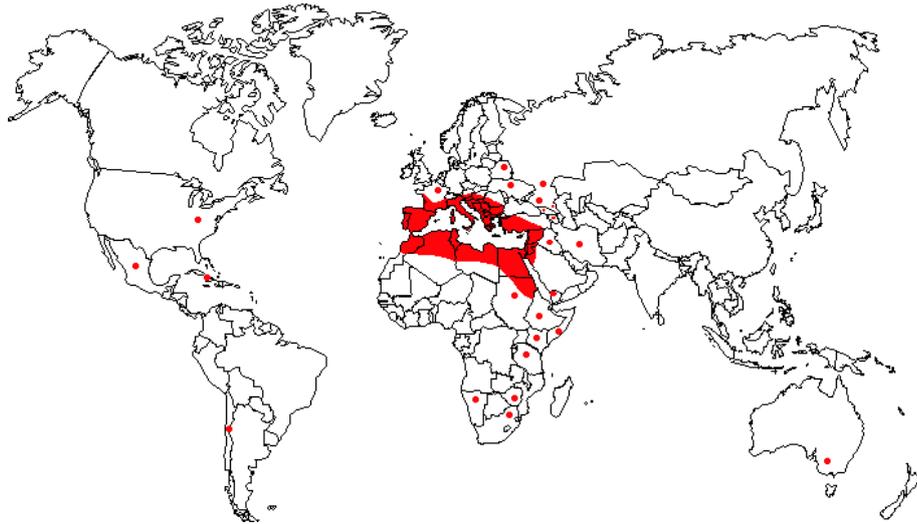


Figure 4 : Distribution de l'orobanche rameuse autour du globe (d'après Parker, 2012)

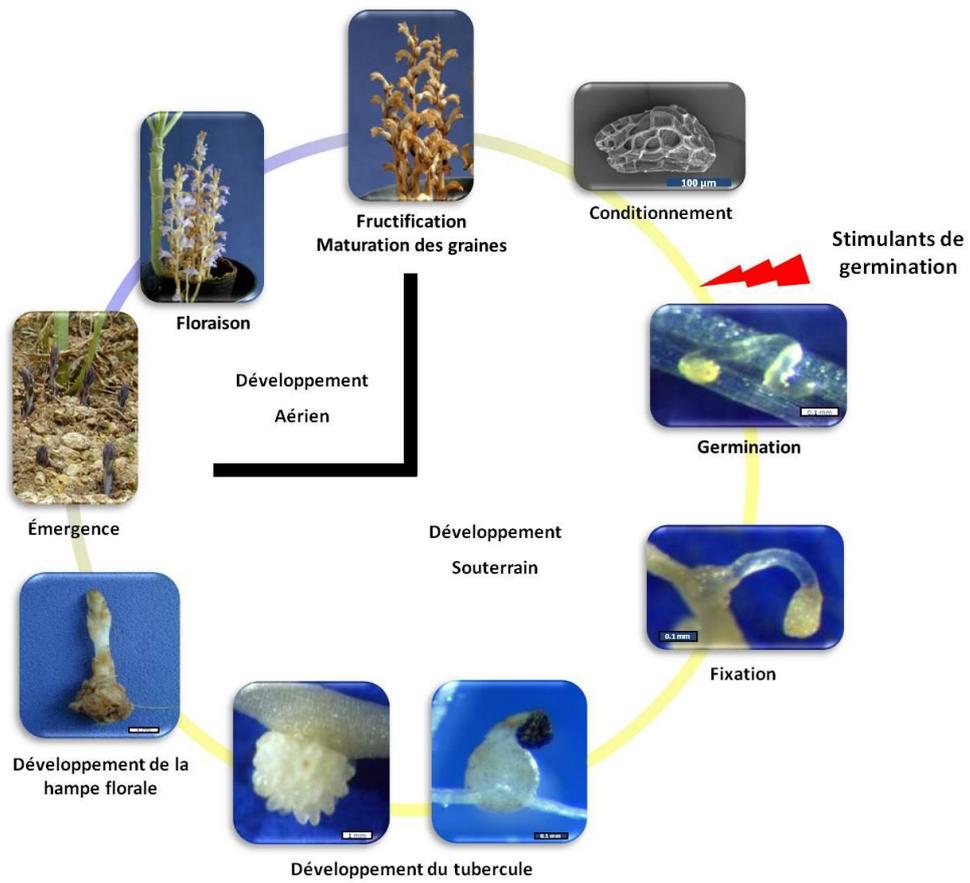


Figure 5 : Cycle biologique de l'orobanche rameuse

"figée" et l'utilisation de marqueurs moléculaires participe à une remise en cause constante des classifications existantes et un affinement de l'histoire évolutive végétale. L'amélioration des techniques de discrimination a par exemple permis de distinguer *O. cernua* et *O. cumana*, longtemps considérées comme une seule et même espèce (Pujadas-Salvà and Velasco, 2000 ; Benharrat *et al.*, 2002 ; Delavault and Thalouarn, 2002), même si le débat reste encore ouvert (Schneeweiss *et al.*, 2004a), et permettra probablement d'ici peu de discerner plus précisément les différentes espèces d'*Orobanche* et de *Phelipanche*.

Parmi les nombreuses espèces du genre *Orobanche sensu lato*, seule une vingtaine s'avère être classée comme phytopathogène de grandes cultures. Elles représentent un problème agronomique conséquent puisqu'environ 16 millions d'hectares de terres arables sont menacés autour du bassin méditerranéen et en Asie de l'Ouest (Qasem, 2006). Nous citerons principalement *O. cumana* Wallr., *O. cernua* Loefl., *O. crenata* Forsk., *O. minor* Sm., *O. foetida* Poir., *P. aegyptiaca* Pers. et *P. ramosa* (L.) Pomel., dont les hôtes cultivés les plus courants sont détaillés **Tableau I** (Annexe).

1.3. *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel, dite l'orobanche rameuse

L'orobanche rameuse (**Fig. 1**) est une plante achlorophyllienne holoparasite, munie d'une tige simple ou ramifiée à inflorescence spiciforme (en l'occurrence l'épi est plutôt lâche). Sans rentrer dans les détails, elle est caractérisée par des feuilles réduites à des écailles courtes plus ou moins charnues, et par des fleurs sessiles zygomorphes blanches à bleues lilas, tubuleuses à la base et axillées par une bractée et deux bractéoles latérales (Habashi and Jeanmonod, 2008). Bien que largement distribuée à travers le monde, l'orobanche rameuse est principalement localisée autour du bassin méditerranéen (**Fig. 4**) où les conditions pédoclimatiques spécifiques (température, pluviométrie, pH des sols...) et l'intensification des cultures sensibles contribuent à son expansion. Elle est considérée comme une adventice principalement en Europe, dans une partie de l'Afrique et de l'Asie, ainsi qu'au Moyen Orient. Toutefois, une extension non négligeable des zones infestées est observée depuis les dernières décennies due principalement au déplacement des graines via l'activité humaine (introductions aux USA, à Cuba, en Amérique Centrale, en Australie et en Afrique du Sud) (Joel *et al.*, 2007 ; Habashi and Jeanmonod, 2008). Cette espèce d'orobanche s'avère proche morphologiquement et phylogénétiquement de *Phelipanche aegyptiaca* (large spectre d'hôtes similaire ; **Tab. I Annexe**) avec qui elle pourrait semble-t-il s'hybrider naturellement (Musselman, 1986).

- **Un cycle biologique particulier**

De façon commune aux autres holoparasites, le cycle de vie de l'orobanche rameuse (**Fig. 5**) est assez atypique comparé aux angiospermes "classiques", du fait de son haut degré de dépendance et de synchronisation à celui de la plante hôte (Brault *et al.*, 2007 ; Gibot-Leclerc *et al.*, 2012, 2013). Ce cycle se divise en 2 phases bien distinctes. La première phase dite "indépendante", allant de l'imbibition de la graine au développement de la radicule, est réalisée

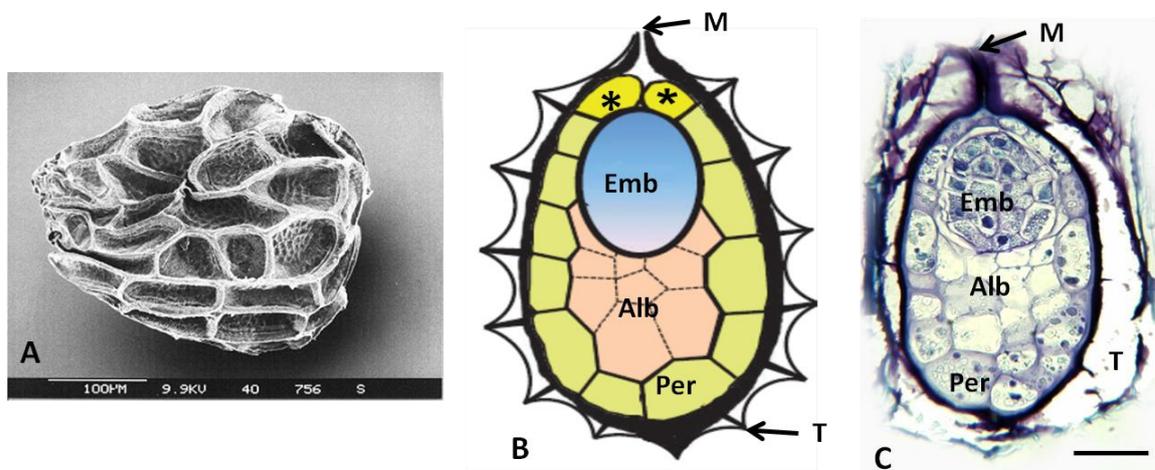


Figure 6 : Graine d'orobanche rameuse

M, micropyle ; Emb, embryon ; Alb, albumen ; Per, périsperme ; T, tégument

A : électronographie présentant l'ornementation caractéristique des téguments (Höniges, 2009)

B : schéma d'une coupe longitudinale, * site des récepteurs putatifs des stimulants de germination (Plakhine *et al.*, 2012)

C : coupe longitudinale, échelle 50 μm (Lechat *et al.*, 2012)

grâce aux réserves contenues dans la graine. L'indépendance n'est ici qu'énergétique puisqu'un signal chimique émis par le système racinaire de l'hôte dans la rhizosphère est nécessaire à l'induction de la germination. La seconde phase dite "dépendante" débute par la mise en place de l'haustorium et la connexion du parasite au système vasculaire de la plante hôte. De cette étape de fixation dépend la survie et le développement de la plante parasite (Joel *et al.*, 2007). Il s'agit donc de l'étape la plus sensible du cycle de vie des holoparasites, mais la forte abondance des graines dans le sol est telle que la part de germinations non fructueuses (pas de fixation à l'hôte) n'impacte pas sur la pérennisation de l'espèce parasite. L'orobanche rameuse, plante principalement autogame (Musselman *et al.*, 1982 ; Brault *et al.*, 2007) a une "stratégie r", c'est-à-dire qu'elle produit un très grand nombre de graines microscopiques (200 à 300 μm) afin de conserver un haut degré d'adaptabilité aux conditions environnementales (Irving and Cameron, 2009). Toute une partie du cycle de vie de l'orobanche a donc lieu sous la surface du sol, et seule l'inflorescence spiciforme finit par émerger.

- **Les graines**

Le tégument de la graine d'orobanche est caractérisé par une ornementation alvéolaire (**Fig. 6A**) provenant de la déshydratation d'une assise cellulaire maternelle (seules les parois cellulaires restent visibles). L'ornementation étant spécifique de l'espèce, elle peut être utilisée à des fins de détermination (Plaza, 2004). Les graines ovoïdes sont principalement constituées de réserves lipidiques, surtout des acides oléique et linoléique chez *P. aegyptiaca* (Bar-Nun and Mayer, 2002). L'albumen, composé de 3 ou 4 couches de cellules, contient un grand nombre de globules lipidiques et de granules d'amidon (**Fig. 6B et C**). Il entoure un embryon elliptique primitif ou indifférencié (nommé également protocorme) dépourvu de racine, de gemmule et de cotylédon. Les 2 cellules du périsperme (couche de cellule entourant l'embryon primitif et l'albumen) jouxtant le micropyle sont supposées contenir les récepteurs putatifs aux stimulants de germination (Joel *et al.*, 2011a ; Plakhine *et al.*, 2012 ; Gibot-Leclerc *et al.*, 2012 ; Lechat *et al.*, 2012). Du fait de leur petite taille, ces graines sont facilement dispersées par le vent (anémochorie), l'eau (hydrochorie), les machines agricoles, les animaux (exo et endozoochorie) et leurs litières, mais aussi sur de longues distances via des lots de semences contaminés (Qasem, 2006 ; Secomb *et al.*, 2006 ; Ginman, 2009).

- **Une période de conditionnement chez l'orobanche**

Après maturation et dessiccation, les graines d'orobanche (**Fig. 6**) sont plus ou moins enfouies dans le sol où elles entrent en phase de dormance, état adapté à l'attente de conditions environnementales favorables à la germination. La période de conditionnement correspond à l'étape physiologique nécessaire à la levée de dormance et suite à laquelle les graines d'orobanche deviennent sensibles aux stimulants de germination. La notion de dormance invoquée ici semble être spécifique aux orobanches, puisqu'elle ne correspond pas à la levée d'une dormance physique, mais uniquement à la mise en place de la machinerie

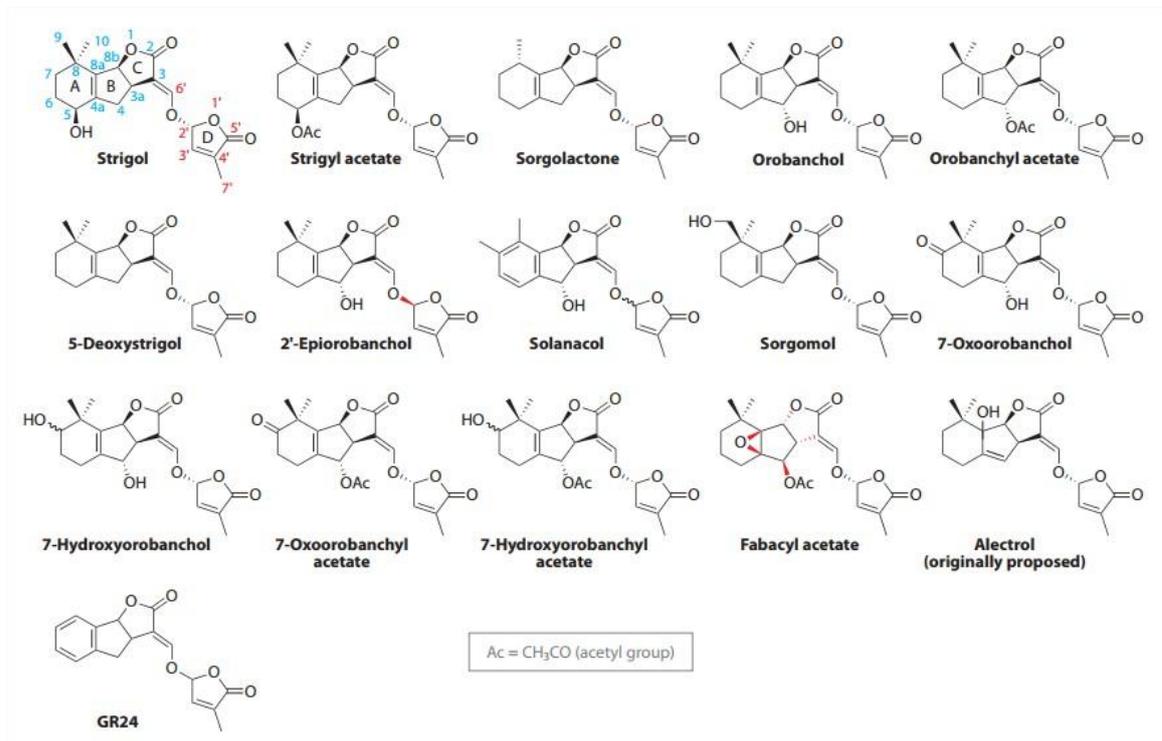


Figure 7 : Structure des principales strigolactones d'origine naturelle et d'un analogue synthétique (GR24) (Xie *et al.*, 2010)

nécessaire à la perception des stimulants (Lechat *et al.*, 2012). La période de conditionnement, qui dure au minimum 4 jours chez *P. ramosa* (en conditions *in vitro* optimales), débute par l'imbibition de la graine. L'entrée d'eau ayant lieu rapidement via le micropyle (Joel *et al.*, 2011a), le taux d'hydratation maximal est atteint en approximativement 1 h. Plusieurs phénomènes physiologiques ont ensuite été démontrés, témoignant d'une reprise métabolique rapide. La graine atteint tout d'abord une capacité énergétique optimale (Adenylate Energy Charge = 0,9) au bout d'une journée. Une forte baisse du niveau d'acide abscissique (ABA) est également observée sur cet intervalle de temps chez *P. ramosa* (Lechat *et al.*, 2012), de façon concomitante à une décharge importante d'ABA dans le milieu extérieur, chez *O. minor* (Chae *et al.*, 2004). Un pic respiratoire et une très forte reprise de la synthèse protéique ont lieu chez *P. aegyptiaca* (Bar-Nun and Mayer, 1993), ainsi qu'une forte activité d'oxydases alternatives (Bar-Nun, 2003). Uematsu et associés ont également mis en évidence une nette accumulation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) corrélée à une synthèse de gibbérellines (GA) dans les graines d'*O. minor* (Uematsu *et al.*, 2007), alors qu'à l'inverse, une diminution de la quantité d'AMPC a été observée chez *P. ramosa* (comm. pers. Lechat 2013) Tous ces événements physiologiques participent potentiellement à la mise en place des mécanismes indispensables à la perception des stimulants ou à la translocation de ce signal et donc à la germination des graines d'orobanche, sans toutefois connaître à ce jour le mécanisme sous-jacent.

Il est important de préciser qu'il s'agit d'un phénomène réversible. En absence d'une plante hôte à proximité (aucun signal perçu), les graines entrent dans une phase de dormance secondaire ou "humide" (Kebreab and Murdoch, 1999b). Ce mécanisme leur permet ainsi de passer la mauvaise saison (conditions environnementales défavorables, décalage par rapport au cycle de la plante hôte...). Ces graines devront obligatoirement passer par un nouveau cycle de dessiccation / conditionnement pour être à nouveau sensibles aux stimulants de germination d'une plante hôte (Mohamed *et al.*, 1998 ; Matusova *et al.*, 2004). Ce phénomène apparaît comme étant l'une des clefs de la grande longévité des graines de certaines plantes parasites (au moins 10 ans ; Joel *et al.*, 2007).

- **La germination : stimulants de germination et mode d'action**

Contrairement aux autres angiospermes, les graines de certaines plantes parasites sont incapables de germer sans l'aide d'un stimulus chimique (xenognosin) émis par les racines de plantes environnantes. C'est le cas de nombreux holoparasites de racine dont *Striga* spp., *Orobanche* spp. et *Phelipanche* spp. font partie. Bon nombre de travaux ont été axés sur l'identification de ces stimulants de germination, qui appartiennent, pour une bonne partie d'entre eux, à la famille des sesquiterpènes lactones, dont font partie les strigolactones (SLs ; **Fig. 7**). Cook et collaborateurs furent les premiers à identifier le strigol, exsudé par les racines de coton, et capable d'induire la germination de *Striga hermonthica* à des doses très basses de l'ordre de 1.10^{-5} ppm soit 1.10^{-11} M (Cook *et al.*, 1966, 1972). Ces composés dérivent de la voie de biosynthèse des caroténoïdes (Matusova *et al.*, 2005 ; Humphrey and Beale, 2006 ; Sun, 2008). De très nombreux criblages de l'activité de molécules naturelles de la famille des sesquiterpènes lactones ont été menés et le sont encore face à l'enjeu scientifique et

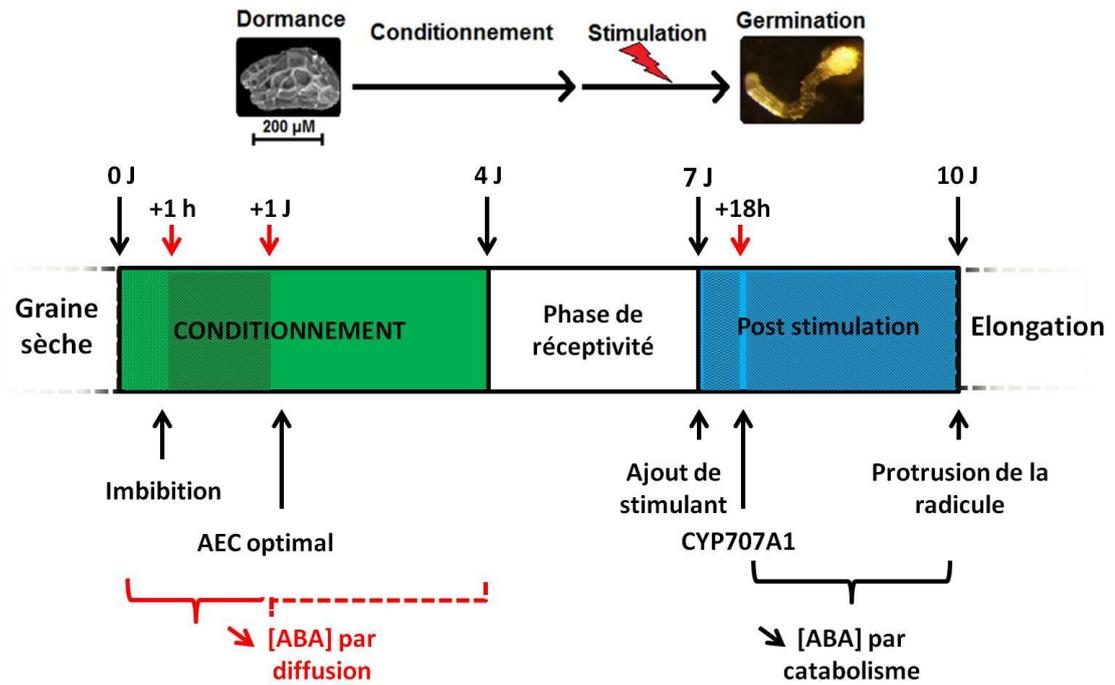


Figure 8 : Schéma récapitulatif du processus de germination de *P. ramosa* (Lechat, 2013)
 AEC, adenylate energy charge ($AEC = \frac{ATP + 0,5 ADP/AMP + ADP + ATP}{ATP + ADP + AMP}$) ; ABA, acide abscissique ;
 CYP707A1, gène codant pour une ABA-8-hydroxylase.

économique important que constitue l'identification des structures conformationnelles reconnues par les récepteurs, à l'origine d'activités biologiques différentes chez les plantes et champignons mycorhiziens (Herb *et al.*, 1987 ; Fischer *et al.*, 1989 ; Yokota *et al.*, 1998 ; Galindo *et al.*, 2002 ; Sato *et al.*, 2005 ; Awad *et al.*, 2006 ; Xie *et al.*, 2009a, 2007, 2008b,a, 2009b ; Evidente *et al.*, 2009 ; Yoneyama *et al.*, 2011), de façon conjointe à la mise au point de SLs de synthèse telles que le GR24 (Johnson *et al.*, 1976; Mangnus *et al.*, 1992; Nefkens *et al.*, 1997 ; Wigchert *et al.*, 1999; Boyer *et al.*, 2012; Rasmussen *et al.*, 2012). En effet, les travaux de Gomez-Roldan *et al.* (2008) Umehara *et al.* (2008) ont mis en lumière le potentiel des SLs comme nouvelle classe d'hormones végétales. Les SLs agissent comme messagers secondaires des auxines (AIA) et des cytokinines (CKs) et se révèlent ainsi impliqués, chez les plantes, dans des processus majeurs tels que le contrôle de la ramification aérienne et racinaire, le contrôle des interactions avec les plantes parasites et les microorganismes symbiotiques de la rhizosphère (champignons mycorhiziens à arbuscules et bactéries), ainsi que dans la réponse aux contraintes nutritionnelles (Crawford *et al.*, 2010; Koltai, 2011 ; Brewer *et al.*, 2012 ; Dun *et al.*, 2012 ; Marzec *et al.*, 2013).

Des stimulants de germination appartenant à d'autres familles ont également été identifiés. C'est le cas du dihydrosorgoleone chez le sorgho (Chang *et al.*, 1986), de certains isothiocyanates chez les *Brassicaceae* (Georgieva and Dimitrova-Kostova, 1984 ; Virtue *et al.*, 2006 ; Auger *et al.*, 2012), du dehydrocostus lactone chez le tournesol (Joel *et al.*, 2011b), de chalcones et d'un polyphénol (peapolyphenol) chez le pois (Evidente *et al.*, 2010), ainsi que du soyasapogenol, du trans-22-dehydrocampesterol chez la vesce (Evidente *et al.*, 2011b). D'une façon générale, l'identification de ce type de molécules reste assez complexe à cause de la très faible concentration présente dans les exsudats racinaires de plantes. L'utilisation des graines de plantes parasites comme outil de bioguidage est une technique assez répandue, du fait de leur grande sensibilité.

Les mécanismes de perception des SLs ont longtemps été considérés comme une boîte noire. A l'heure actuelle, les récepteurs impliqués dans leur perception ne sont pas connus. On suppose seulement leur localisation au niveau des 2 cellules du périsperme jouxtant le micropyle (Joel *et al.*, 2011a ; Plakhine *et al.*, 2012 ; Lechat *et al.*, 2012). Cependant, une étude récente a permis de mettre en lumière le rôle primordial du gène *CYP707A* codant pour une ABA 8'-hydroxylase dans la germination des graines de *P. ramosa* en réponse à une SL synthétique (GR24 ; Lechat *et al.*, 2012). En effet, suite à une première baisse du niveau d'ABA (**Fig. 8**) durant l'étape de conditionnement (fuite d'ABA), la perception du GR24 induit très rapidement une forte surexpression du gène *CYP707A1* (18 h après stimulation) codant pour une ABA 8'-hydroxylase impliquée dans le catabolisme de l'ABA, et provoquant ainsi une seconde chute du niveau d'ABA dans les graines. Les SLs contribuent ainsi à la levée de la dormance par la chute de la teneur en ABA. Leur rôle dans la germination pourrait finalement être plus complexe au vu des récents travaux de Toh *et al.* (2012) chez *A. thaliana* qui suggèrent une action inhibitrice des SLs sur la synthèse de l'ABA et stimulatrice de celle des GAs. Chez *P. ramosa*, un apport exogène de GAs seul ne stimule pas la germination. Il a été observé par contre, en réponse au GR24, une surexpression des gènes impliqués dans la synthèse des GAs (*GA20ox1* fortement surexprimé après 6h) et une sous-expression des gènes impliqués dans leur catabolisme (*GA2ox2* fortement sous-exprimé dès 2h) en aval de la surexpression du gène *CYP707A1* (comm. pers. Lechat 2013). De façon semblable, les SLs joueraient un rôle important post-*CYP707A* dans la synthèse des CKs

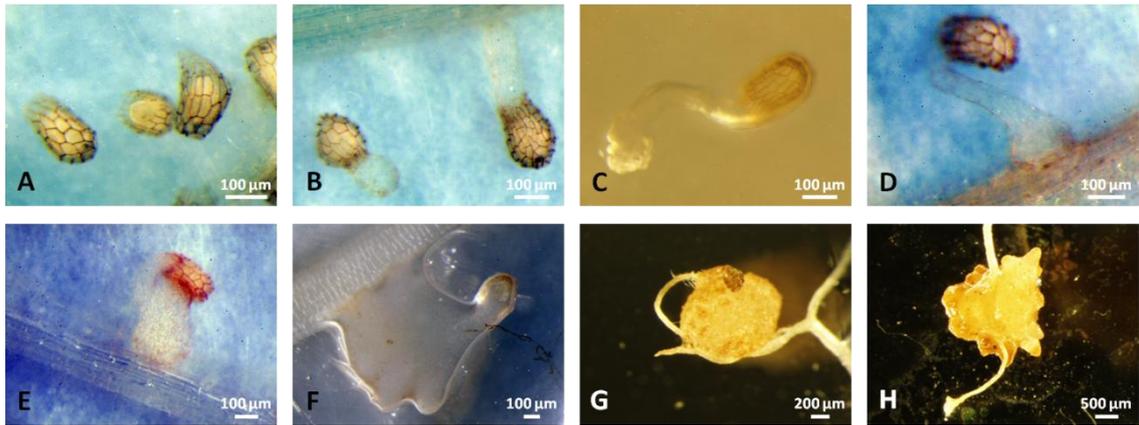


Figure 9 : Stades précoces de développement de l'orobanche rameuse

- A** : imbibition des graines et ouverture du micropyle
- B** : élongation de la radicule vers la racine hôte (chimiotropisme)
- C** : initiation haustoriale
- D** : fixation à la racine de l'hôte
- E** : mise en place de l'haustorium
- F** : développement de l'haustorium et du tubercule
- G, H** : développement du tubercule

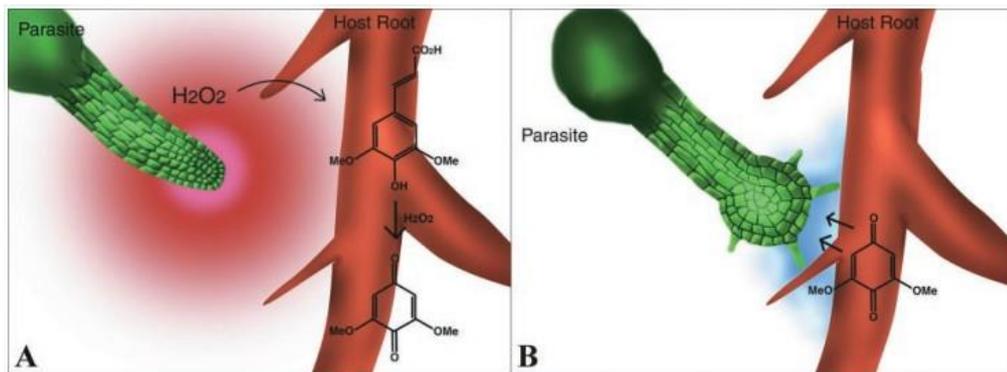


Figure 10 : Mécanismes d'initiation haustoriale chez *Triphysaria* et *Striga* (Keyes et al., 2001)



Figure 11 : Arrêt de l'initiation haustoriale chez *Striga* spp (Press and Graves, 1995)

dans les graines de *Striga*, hormone ayant un impact direct sur la synthèse d'éthylène (Chae, 2003; Davies, 2010), elle-même connue pour sa capacité à induire la germination du parasite (Zehhar *et al.*, 2002; Sugimoto *et al.*, 2003). Enfin, l'AIA jouerait aussi un rôle dans la cascade d'évènements post-*CYP707A* et précédant la germination *sensu stricto* puisqu'une synthèse et un relargage d'AIA dans le milieu extérieur sont observés 24 h après stimulation (Slavov *et al.*, 2004). Les étapes de perception et transduction du signal en amont du gène *CYP707A* restent encore méconnues (Janssen and Snowden, 2012). La fin de la germination *sensu stricto* a lieu (3 jours après stimulation en condition *in vitro* optimales) au moment où la graine de *P. ramosa* émet un tube germinatif dépourvu de coiffe racinaire (également nommé radicule ou procaulôme) au niveau du pôle micropylaire. Ce dernier s'allonge en direction de la racine hôte (**Fig. 9A et B**) probablement sous l'influence d'un gradient croissant de concentration de la molécule stimulante émise par la racine hôte (Bouwmeester *et al.*, 2003).

- **Crosstalk, initiation haustoriale et fixation à la racine hôte**

On nomme "crosstalk" le dialogue chimique qui s'établit entre la racine hôte et la radicule du parasite et qui précède l'établissement de connexions vasculaires. La première étape de ce dialogue est, comme nous l'avons détaillé ci-dessus, la perception du stimulus germinatif par la graine du parasite, et l'allongement de la radicule en direction de la racine hôte (**Fig. 9A et B**). La seconde étape, qui précède la pénétration de la radicule dans la racine hôte, regroupe les mécanismes d'initiation haustoriale (**Fig. 9C et 9**). Ces mécanismes, encore mal connus chez les orobanches, ont principalement été décrits chez des hémiparasites (*Striga* et *Triphysaria*) où l'initiation haustoriale est plus prononcée, avec un gonflement plus important et une différenciation de poils haustoriaux (Baird and Riopel, 1985 ; Yoder, 2001). Ces parasites utilisent des signaux chimiques dérivés de l'hôte (Hautorium-Inducing Factors = HIFs) pour déclencher la transition développementale permettant de passer de l'élongation de la radicule (élongation ou divisions cellulaires longitudinales) à la formation de l'haustorium (gonflement issue de divisions cellulaires radiales). Le processus de génération du signal chimique (semagenesis) semble être induit par la radicule du parasite. En effet, une activité peroxydase induisant l'émission d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), a été démontrée au niveau de l'apex de la radicule (**Fig. 10** ; Kim *et al.*, 1998 ; Mor *et al.*, 2008). Ces ROS induisent une dégradation des parois cellulaires de l'épiderme de la racine hôte, peut-être concomitante à une réaction de défense localisée de cette dernière (El-Maarouf-Bouteau *et al.*, 2008), donnant lieu à une émission de molécules du type composés phénoliques, quinones, pectines et acides organiques (tel que l'acide syringique). Une partie de ces composés est alors oxydée par le biais de peroxydases et de leur co-facteur, l' H_2O_2 , en benzoquinones qui sont à leur tour oxydées par des quinones oxydoréductases en semi-quinones du type DMBQ, connues pour leur activité HIF. L'ensemble de ce processus établit un gradient redox local entre les cellules épidermiques de l'hôte et du parasite. Si l'accumulation des molécules signal reste insuffisante, le méristème radiculaire est capable de revenir à un état végétatif nécessaire pour la reprise de l'allongement de la radicule (**Fig. 11** ; Keyes *et al.*, 2000, 2001 ; Matvienko *et al.*, 2001 ; Palmer *et al.*, 2004 ; Joel *et al.*, 2007). Toutefois, les molécules signal impliquées dans ce crosstalk peuvent varier suivant les espèces. De façon intéressante, Jamison et Yoder ont montré que la réceptivité au DMBQ chez *Triphysaria* est héréditaire et influencée par les facteurs maternels

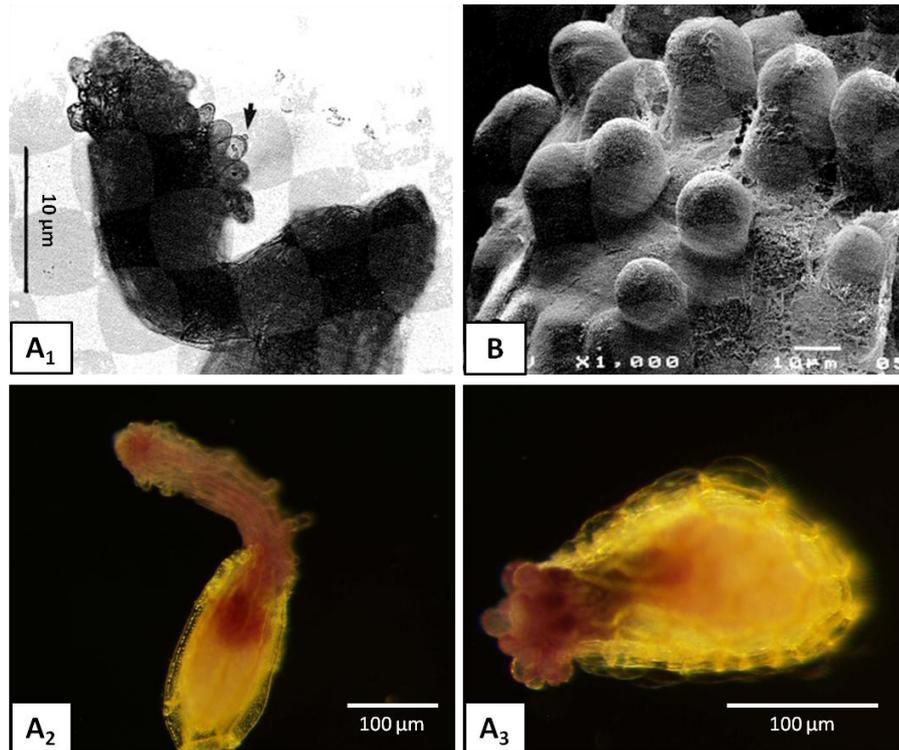


Figure 12 : Initiation haustoriale et développement des papilles chez *O. cumana*

(A₁ et B ; Joel and Losner-Goshen, 1994)

A₁ A₂ et A₃ : radicule munie de nombreuses papilles (la flèche indique une goutte de sécrétion)

B : électronographie de papilles

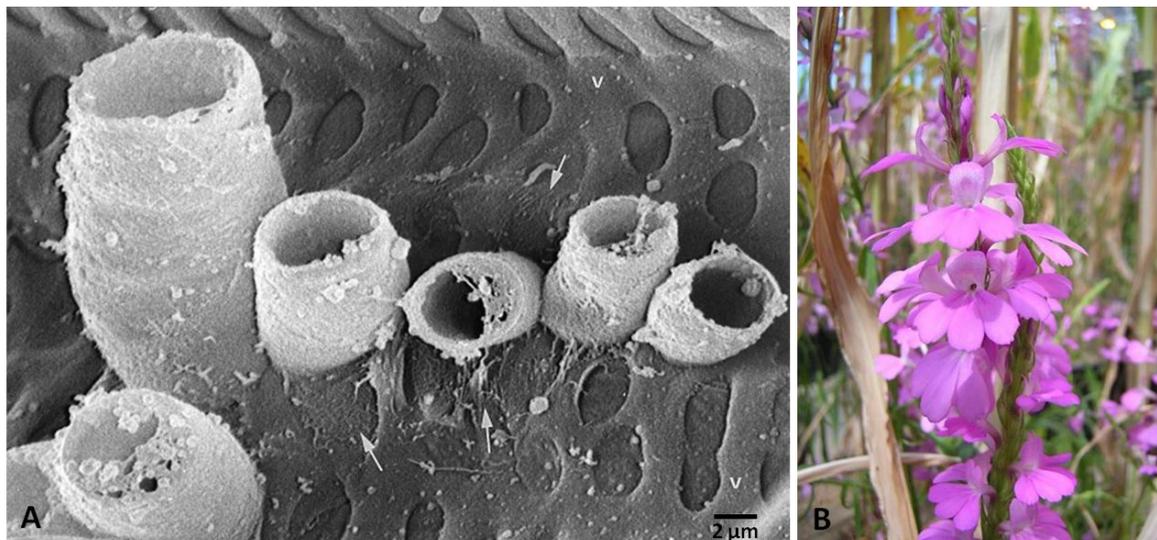


Figure 13 : Connexions vasculaires chez *Striga hermonthica* (Dörr, 1997)

A : électronographie de connexions xylémiennes lumineuses (*oscula*) entre *Striga hermonthica* et *Zea mays*

B : *Striga hermonthica*

(Jamison and Yoder, 2001). Cela suggère donc l'implication des HIFs dans la définition du spectre d'hôtes propre à chaque plante parasite.

Suite à ce dialogue moléculaire, l'haustoriogenèse proprement dite a lieu. L'élongation de la radicule est stoppée pour laisser place à un phénomène d'expansion radiale et à la différenciation de cellules épidermiques en sortes de papilles (chez les *Orobanche*) (**Fig. 12A et B**) ou de poils haustoriaux (chez *Triphysaria* par exemple). L'implication d'expansines (Keyes *et al.*, 2001) et l'accumulation de phytohormones (auxine et éthylène) à l'apex de la radicule (Tomilov, 2005) ont été démontrées durant cette étape. Les papilles haustoriales sécrètent alors une substance glucidique mucilagineuse (**Fig. 12A**) qui favorise l'adhésion du parasite à la racine de l'hôte (Joel and Losner-Goshen, 1994). Un *appressorium*, composé de cellules intrusives, commence alors à pénétrer dans le cortex racinaire de la plante hôte (**Fig. 9D**). Ce phénomène mécanique est facilité par la sécrétion d'enzymes à activité pectine-méthylestérase et polygalacturonase (Ben-Hod *et al.*, 1993 ; Losner-Goshen *et al.*, 1998 ; Véronési *et al.*, 2007) qui permettent d'adapter la composition chimique et les propriétés physiques des parois des cellules hôtes au développement de l'haustorium, sans impliquer de processus destructifs qui pourraient engendrer une réaction de défense forte de la part de l'hôte. Une cysteine protéase pourrait également jouer un rôle lors de la mise en place de l'haustorium chez *Cuscuta reflexa* (Bleischwitz *et al.*, 2010). Une étude récente suggère qu'une arabinogalactane protéine (attAGP) jouerait un rôle lors des premières étapes de l'haustoriogenèse en facilitant l'attachement du parasite à la racine hôte par la création d'interactions entre pectines, et ce chez *C. reflexa* et *P. aegyptiaca* (Rehker *et al.*, 2012). Ce phénomène pourrait donc être assez bien conservé chez les plantes parasites. L'endoderme représente la dernière barrière physique que l'*appressorium* doit traverser avant d'atteindre le cylindre central contenant les faisceaux cribro-vasculaires. Cette dernière étape pourrait être facilitée par l'excrétion d'enzymes à activité cutinase chez l'orobanche (Joel *et al.*, 1998). L'haustorium *sensu stricto* (**Fig. 9E, F, G et H**) se différencie, permettant ainsi au parasite de détourner l'eau, les sels minéraux, les hormones et les composés organiques nécessaires à son développement.

- **Établissement de connexions vasculaires**

La nature des connexions réalisées au sein de l'haustorium diffère selon le type trophique du parasite et suivant les espèces. En effet, un hémiparasite obligatoire "xylem-feeder" tel que *Striga* (*S. asiatica* et *S. hermonthica*), met en place des connexions directes avec le xylème de l'hôte via un organe spécifique nommé *oscula* (sortes de pailles de prélèvement ; **Fig. 13**), mais peu ou pas de connexions phloémiennes (Rogers and Nelson, 1962 ; Dörr, 1996, 1997). L'orobanche, holoparasite du type "phloem-feeder", développe quant à elle des connexions phloémiennes, mais également xylémiennes, d'ailleurs communes à toutes les *Orobanchaceae* holo- et hémiparasites.

Malgré la difficulté de caractérisation des différents types de connexions (morphologie et taux de lignification des tissus variables, distinction hôte/parasite difficile...), de nombreuses études ont été réalisées afin de mieux comprendre la mise en place de ces dernières, et d'en

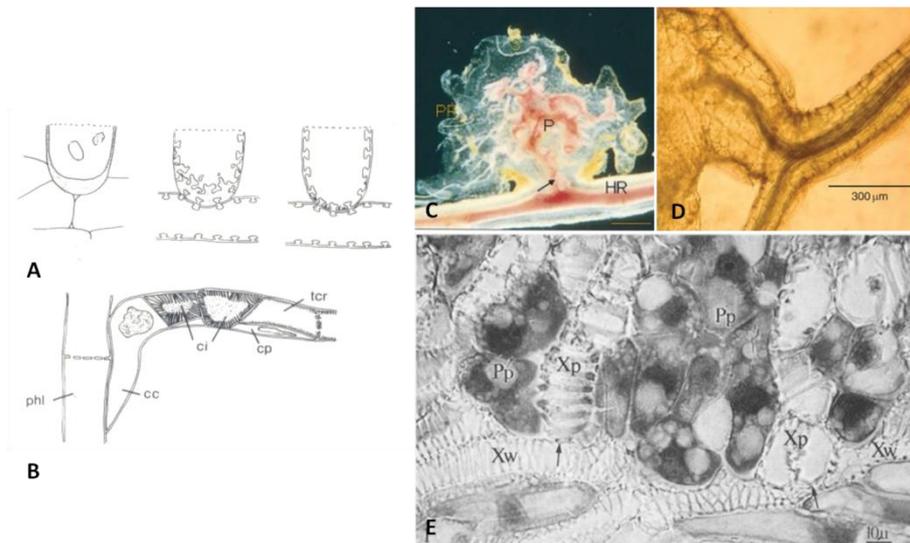


Figure 14 : Connexions vasculaires chez les orobanches

A : mise en place des connexions xylémiennes luminales (Dörr and Kollmann, 1976)

B : mise en place des connexions phloémiennes (Dörr and Kollmann, 1975)

phl, phloème de l'hôte ; cc, cellule de contact ; ci, cellules intermédiaires ; tcr, tubes criblés du parasite ; cp, cellules compagnes du parasite

C : mise en évidence des connexions vasculaire par coloration au phloroglucinol acide (Zhou, 2004)

P, parasite ; PR, racines adventives ; HR, racine de l'hôte

D : mise en évidence des connexions vasculaires par décoloration des tissus

E : coupe d'un haustorium montrant les connexions xylémiennes entre *O. crenata* et *Vicia faba*

(Dörr and Kollmann, 1976), Xw, xylème hôte ; Xp, xylème du parasite ; Pp, parenchyme du parasite

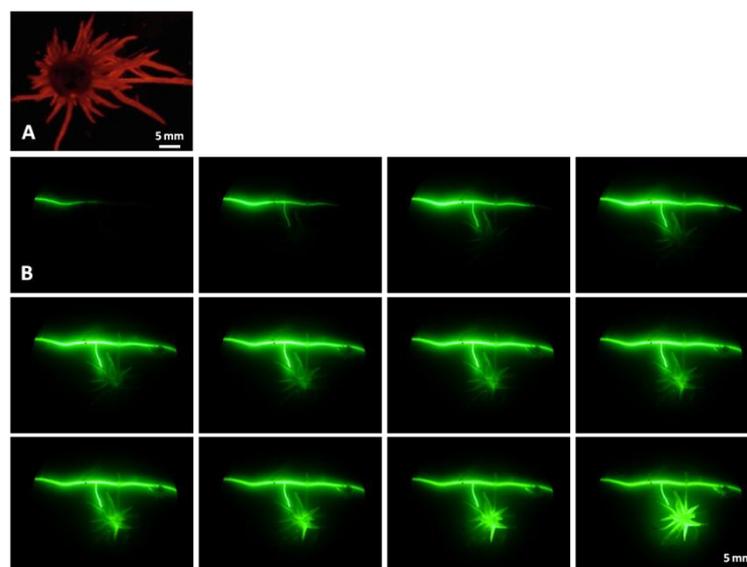


Figure 15 : Continuum vasculaire entre l'orobanche et son hôte

A : continuum xylémien mis en évidence grâce au Texas Red (Aly *et al.*, 2011)

B : continuum phloémien mis en évidence grâce à la 6-carboxyfluorescéine (de 1 à 20 min)

identifier les différents types. Chez l'orobanche, la mise en place de ces connexions a lieu rapidement lors de l'haustoriogenèse. À l'extrémité de l'endophyte, autrement dit au niveau du contact entre les cellules de l'hôte et du parasite, les cellules intrusives, qui dès le contact avec le parenchyme hôte parviennent à établir un transfert apoplastique de nutriments à travers leur paroi (Aber *et al.*, 1983 ; Joel, 2013), se différencient en cellules absorbantes (ou digitiformes ou de transfert) de 2 types. D'une part, des cellules digitiformes à paroi terminale épaissie donnant transitoirement un ensemble de circonvolutions appelées "labyrinthes" peuvent être observées. Elles sont actives dans le prélèvement de nutriments par transport apoplastique durant les stades précoces du développement haustorial et finissent par se résorber et se lignifier en ménageant des ponctuations face à celles des vaisseaux de la racine hôte (**Fig. 14A** ; Ozenda and Capdebon, 1979). Ces cellules forment ainsi un continuum xylémien, de lumen à lumen, à l'interface hôte - parasite, grâce à la différenciation simultanée des cellules de l'hôte et du parasite sans mise en place d'occlusa (**Fig. 14C, D et E** ; Dörr and Kollmann, 1976 ; Pennypacker *et al.*, 1979 ; Dörr, 1997). Ce continuum a été par ailleurs visualisé par l'utilisation de traceurs xylème mobile au sein de l'interaction *P. aegyptiaca/N. tabacum*. (**Fig. 15A** ; Aly *et al.*, 2011). D'autre part, des cellules absorbantes cellulósiques ayant une organisation plus complexe peuvent aussi être observées. Les cellules du parasite directement en contact avec les cellules phloémiennes de la racine hôte conservent leur noyau et un cytoplasme dense, tandis que les suivantes, dites cellules de transition, différencient en interne un "labyrinthe" constitué par le réticulum endoplasmique (Labrousse *et al.*, 2010). Au-delà, des tubes criblés proprement dits sont observés, accompagnés de cellules compagnes (**Fig. 14B** ; Ozenda and Capdebon, 1979 ; Pennypacker *et al.*, 1979). Des plasmodemes interspécifiques ont été observés au sein de l'interaction *O. crenata/Vicia narbonensis* (Dörr and Kollmann, 1995). Plusieurs études confirment la fréquence d'un continuum phloémien à l'interface hôte - orobanche, avec l'utilisation d'un traceur phloème mobile (**Fig. 15B** ; Péron, 2010) et le constat de la transmission de virus transitant par le phloème (Gal-On *et al.*, 2009 ; Vachev *et al.*, 2010), de protéines fluorescentes (Aly *et al.*, 2011) ou d'herbicides systémiques à mobilité phloémienne (Joel *et al.*, 1995 ; Jurado-Expósito *et al.*, 1999). Par ailleurs, des transferts bi-directionnels d'ARN interférents (RNAi et siRNA pour *small-interference RNA*) et des transferts horizontaux bi-directionnels de gènes mitochondriaux ont été démontrés dans plusieurs interactions (Mower *et al.*, 2004, 2010 ; Roney *et al.*, 2006 ; Barkman *et al.*, 2007 ; David-Schwartz *et al.*, 2008 ; Tomilov *et al.*, 2008 ; Westwood *et al.*, 2009 ; Yoshida *et al.* 2010 ; Aly, 2013).

Toutefois, ce type d'observations ne prouve pas que l'orobanche prélève les photoassimilats et composés azotés réduits majoritairement par voie symplasmique via des plasmodemes, un prélèvement par voie apoplastique faisant intervenir des mécanismes de transport actif n'est pas exclu. Les données quantitatives manquent afin d'évaluer l'importance des différents type de connexions vasculaires (Westwood, 2013) recensées par Hibberd et Jeschke (**Fig. 16** ; Hibberd and Jeschke, 2001).

Enfin, comme le supposaient déjà Privat et Andary en 1973 lorsqu'ils comparaient la mise en place des connexions au sein de l'haustorium à celles ayant lieu dans une greffe, des phytohormones sont impliquées dans les mécanismes de vascularisation (Privat and Andary, 1973). En effet, la formation du continuum vasculaire entre l'hôte et le parasite et la différenciation des éléments du xylème du parasite sont sous contrôle du transport polaire de l'auxine provenant de l'hôte (Harb *et al.*, 2004 ; Bar-Nun *et al.*, 2008 ; Péron *et al.*, 2012).

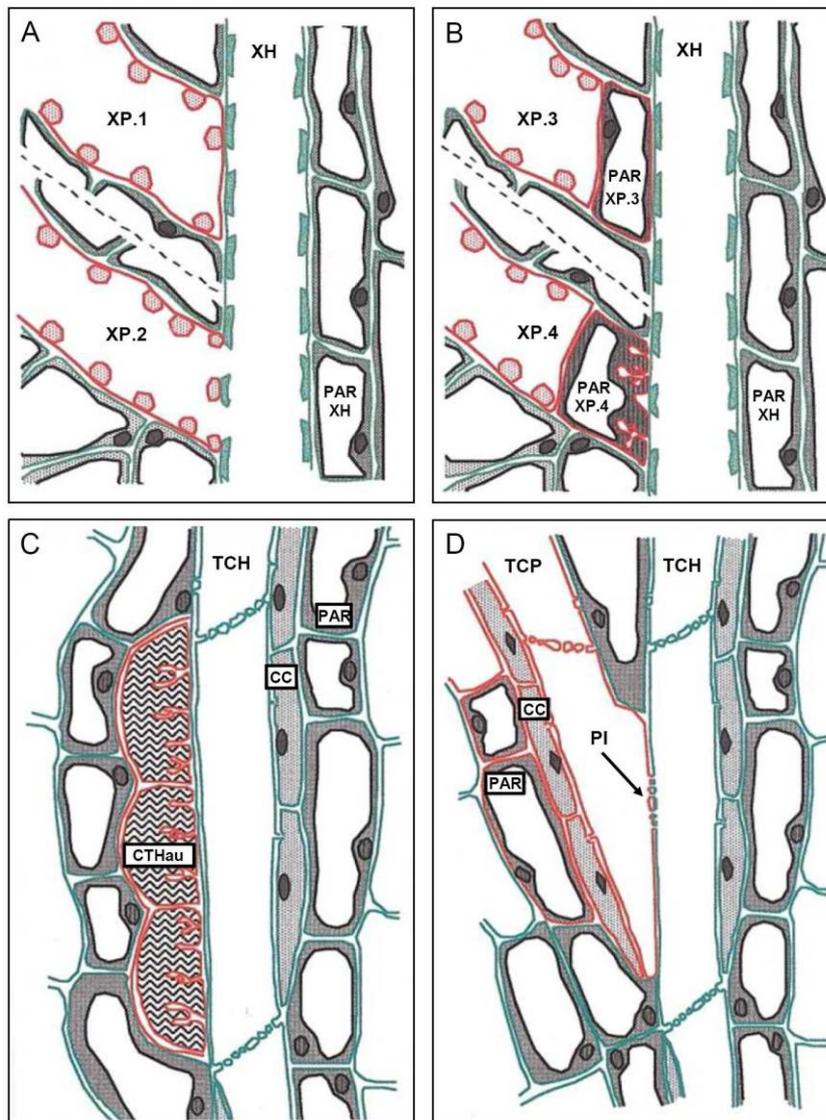


Figure 16 : Voies d'accès potentielles du parasite aux solutés de l'hôte

(Hibberd and Jeschke, 2001)

A : contact xylème-xylème entre l'hôte (XH) et le parasite, sans (XP.1) et avec (XP.2) connexions luminales directes. Aucune connexion n'est établie avec le parenchyme xylémien de l'hôte (PAR XH)

B : mise en place de cellules de transfert du parenchyme xylémien du parasite (PAR XP) munies (XP.4) ou non (XP.3) d'invaginations membranaires facilitant les flux de solutés entre le xylème de l'hôte et celui du parasite.

C : contact phloème-phloème entre l'hôte et le parasite. La décharge phloémienne des solutés présents dans les tubes criblés de l'hôte (TCH) se fait par le biais de cellules de transfert haustoriales (CTHau) ou cellules de contact. CC, cellules compagnes ; PAR, parenchyme

D : plasmodesmes interspécifiques (PI) à l'interface entre les tubes criblés du parasite (TCP) et ceux de l'hôte (TCH).

De la même façon, la prolifération des éléments vasculaires phloëmiens dans le tubercule et la racine hôte à proximité du site de connexion et le développement des connexions phloëmiennes interspécifiques sont probablement dépendants de la relation hormonale hôte - parasite (Joel, 2013).

- **Développement du parasite en post-fixation : cas de l'orobanche**

La mise en place de connexions phloëmiennes avec le système vasculaire de la plante hôte permet à l'orobanche de prélever les composés carbonés et azotés nécessaires à son développement. Une fois ces connexions établies, l'haustorium se développe tout d'abord en une masse qui distend les tissus de la racine de l'hôte, à la surface de laquelle se forme une sorte de verrue (**Fig. 9D et E**) qui devient rapidement un petit tubercule. Au fur et à mesure de sa croissance, ce tubercule émet des racines adventives courtes, coralloïdes et non-géotropiques, pourvues d'une coiffe rudimentaire mais sans zones pilifères, ce qui les rend inefficaces dans le prélèvement de l'eau et des sels minéraux (**Fig. 9H**). Néanmoins, chacune de ces racines est un organe en croissance connecté à l'hôte par voie phloëmienne et contribue ainsi à accroître la force de puits du tubercule, comme démontré par l'accumulation d'un traceur phloème mobile à l'apex de ces racines (Péron, 2010). Cette masse de cellules tubériformes, à la morphologie encore mal définie, constitue un organe de réserve transitoire en accumulant principalement des hexoses, des polyols (mannitol, inositol...), des aminoacides et de l'amidon (Singh *et al.*, 1968 ; Aber *et al.*, 1983 ; Delavault *et al.*, 2002 ; Draie, 2009 ; Abbes *et al.*, 2009a ; Draie *et al.*, 2011). Le tubercule possède également un ou plusieurs méristèmes caulinaires qui, lorsque le parasite percevra les signaux adéquats provenant de l'hôte (nutriments, phytohormones), formeront des tiges écailleuses achlorophylliennes. Les tiges donnent, après émergence, une ou plusieurs hampes florales portant plusieurs dizaines de fleurs. Le niveau de ramification des tiges et le nombre de fleurs par hampe est dépendant de l'espèce. Chaque fleur, après (auto)fécondation, donne une capsule contenant des milliers de graines. Il est important de noter que le cycle de l'orobanche rameuse est synchronisé à celui de sa plante hôte, chaque étape (débourement du bourgeon caulinaire, floraison et fructification) est donc réalisée conjointement à celle de l'hôte (Brault *et al.*, 2007 ; Gibot-Leclerc *et al.*, 2012).

- **Relation sources/puits, force de puits du parasite et transferts hôte-parasite : cas de l'orobanche**

Tous les organes d'une plante nécessitent un apport constant en photoassimilats et composés azotés réduits. Les plantes autotrophes doivent donc procéder à une répartition des composés nutritifs afin d'approvisionner les organes qui n'en produisent peu ou pas. On parle alors de relations sources/puits, par exemple entre des feuilles sources matures hautement photosynthétiques et donc excédentaires en composés nutritifs et des organes puits tels que les jeunes feuilles, les bourgeons ou les racines. La notion de force de puits reflète la capacité d'un organe à importer des solutés. Elle représente donc sa capacité à prélever (activement ou passivement) l'eau et les nutriments en provenance des tissus conducteurs. Les holoparasites vont se comporter comme des organes puits surnuméraires et être hautement tributaires des

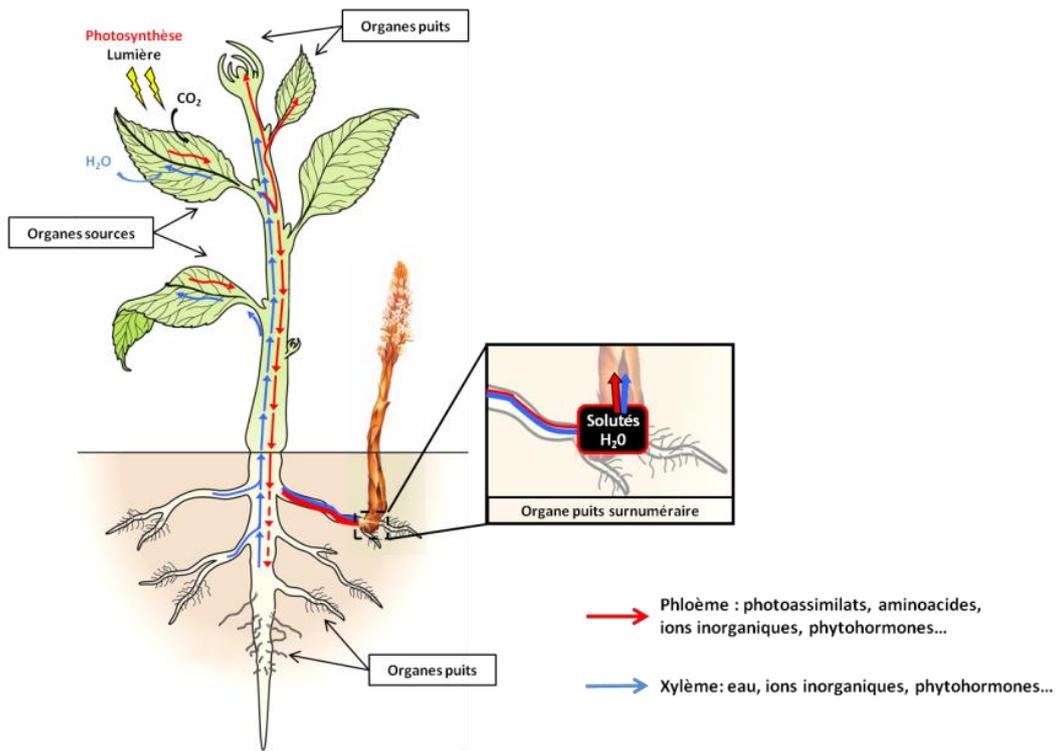


Figure 17 : Relations sources/puits au sein d'une interaction plante hôte – orobanche (d'après Péron, 2010)

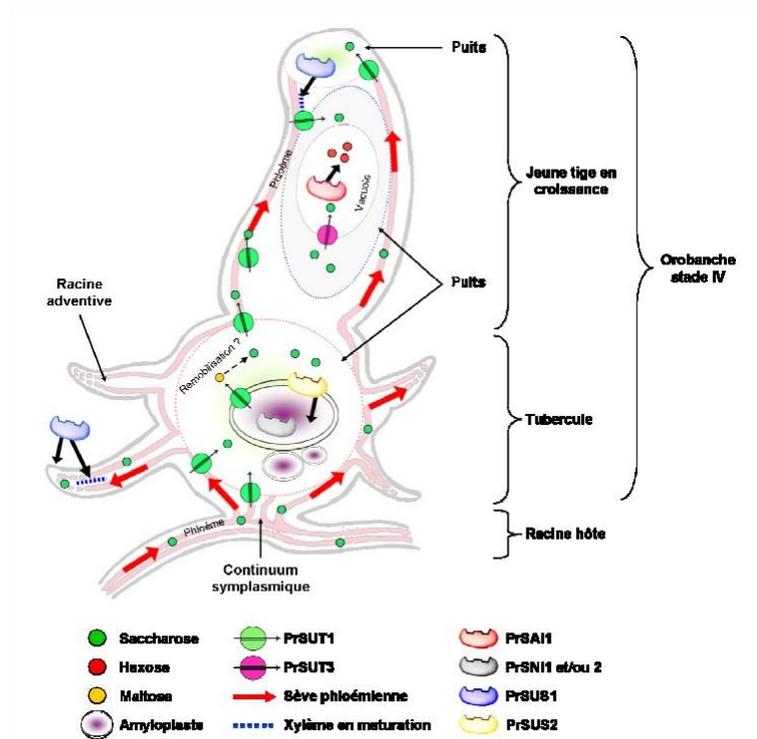


Figure 18 : Modèle théorique de la décharge, du transport et du métabolisme du saccharose chez *P. ramosa* (Péron, 2010)

PrSUT, transporteurs de saccharose de *P. ramosa* ; PrSAI, invertases solubles acides de *P. ramosa* ; PrSNI, invertases solubles neutres de *P. ramosa* ; PrSUS, saccharose synthétases de *P. ramosa*.

composés carbonés et azotés remobilisés à partir des différents organes sources de la plante hôte (**Fig. 17**).

Les orobanches étant des holoparasites achlorophylliens dépourvus de racines fonctionnelles, leur nutrition tant carbonée qu'azotée est donc complètement dépendante des prélèvements effectués chez la plante hôte. L'assimilation de l'azote est un processus hautement dépendant de l'énergie et du carbone, or sans l'apport du pouvoir réducteur et des squelettes carbonés provenant de la photosynthèse concomitant à une faible Activité Nitrate Réductase (NRA), l'utilisation des produits de l'assimilation (aminoacides) provenant de l'hôte semble être la voie de fourniture d'azote la plus efficiente énergétiquement (Press and Graves, 1995; Hibberd *et al.*, 1999 ; Irving and Cameron, 2009). De plus, le taux de transpiration des orobanches étant très faible (Cernusak *et al.*, 2004), il leur est impossible d'obtenir les nutriments par le biais d'une déviation du flux de masse xylémien provenant de l'hôte, comme c'est le cas chez les hémiparasites (Hibberd *et al.*, 1999). Ainsi, l'orobanche détourne la quasi-totalité des nutriments nécessaires à son développement à partir du phloème de l'hôte ("phloem-feeder"), par l'abaissement de son potentiel osmotique dû à l'accumulation de cations, d'hexoses, d'aminoacides et de polyols principalement (Wegmann, 1986 ; Parker and Riches, 1993 ; Press and Graves, 1995 ; Abbes *et al.*, 2009a,b) et le développement de gradients décroissant de concentrations entre les tissus de l'haustorium proches des connexions vasculaires et ses autres organes (Minchin and Lacombe, 2005).

Étant donné la fonction importante d'acquisition des ressources de l'haustorium, il est assez surprenant de constater que les mécanismes physiologiques intrinsèques restent à l'heure actuelle encore mal caractérisés. Du point de vue du carbone, Draie et associés ont démontré l'implication majeure d'une invertase vacuolaire (*PrSA11*) dans la force de puits de la hampe florale de *P. ramosa*, en tant qu'acteur de la décharge phloémienne du saccharose provenant de l'hôte, et de l'accumulation d'hexoses qui en découle (Draie *et al.*, 2011). Péron et collaborateurs ont mis en lumière l'implication d'une saccharose synthase (*PrSus1*) dans l'utilisation du saccharose pour la synthèse de cellulose dans les zones méristématiques et les éléments xylémiens en différenciation (**Fig. 18** ; Péron *et al.*, 2012). L'importance de l'accumulation du mannitol en tant qu'osmoticum impliqué dans l'abaissement du potentiel osmotique, molécule de réserve carbonée, osmoprotectant et chélateur de ROS a également été démontré chez l'orobanche (Harloff and Wegmann, 1993 ; Delavault *et al.*, 2002). En ce qui concerne l'azote, très peu d'études ont été réalisées sur les acteurs de la force de puits et du métabolisme de l'azote chez l'orobanche. Seule l'absence de Glutamine Synthetase 2 (GS2, cf. § "Mécanisme d'assimilation de l'ammonium") chez plusieurs espèces d'orobanche (McNally *et al.*, 1983) et de NRA chez plusieurs *Orobanchaceae* dont *O. minor* (Hunter and Visser, 1986a,b ; Rey *et al.*, 1990) a été démontrée. L'impact d'herbicides inhibiteurs spécifiquement de la synthèse d'aminoacides tend également à prouver que les orobanches possèdent leur propre métabolisme des aminoacides (Gressel, 2009 ; Eizenberg *et al.*, 2012). De plus, l'analyse des profils d'aminoacides d'orobanches et de leurs hôtes tendent à montrer que ces parasites accumulent majoritairement de l'Asp, du Glu et préférentiellement de l'Asn et de la Gln, ainsi que les aminoacides principalement accumulés chez l'hôte, s'ils diffèrent des 4 aminoacides précités (Nandula *et al.*, 2000 ; Abbes *et al.*, 2009a).

Hibberd et collaborateurs ont démontré par mesure directe de la concentration en solutés du xylème et estimation des flux d'eau que 99 % du carbone, 95 % de l'azote, 77 % du soufre, 90 % du potassium et 80 % du sodium quantifiés dans les tissus du parasite provenaient du phloème de la plante hôte, dans l'interaction *O. cernua*/*N. tabacum*. À l'inverse, 90 % du calcium, 62 % du magnésium et de l'eau étaient issus du xylème de l'hôte (Hibberd *et al.*, 1999). Cette interception xylémienne a également été démontrée par l'utilisation de $^{13}\text{NO}_3$ (Kawachi *et al.*, 2008).

- **Impact de l'orobanche sur la plante hôte**

Le prélèvement important de nutriments effectué par le parasite impacte la physiologie de la plante hôte à plusieurs niveaux. D'un point de vue global, l'infestation réduit fortement la biomasse de la plante hôte, bien que la biomasse totale de l'interaction (hôte plus parasite) ne soit pas différente de celle de l'hôte non-infesté. L'accumulation de biomasse du parasite se fait au détriment des organes de l'hôte (racines, tige et organes reproducteurs principalement), à l'exception du compartiment foliaire (Borg, 1986 ; Hibberd *et al.*, 1998). L'orobanche induit également une augmentation nette de la transpiration et de la photosynthèse de l'hôte, ainsi qu'un délai de la sénescence des feuilles sources (Hibberd *et al.*, 1999). L'augmentation de la photosynthèse et le délai de la sénescence des feuilles peut être imputable à la diminution de la concentration en photoassimilats des feuilles de l'hôte du fait des prélèvements effectués par le parasite. En effet, une faible concentration en photoassimilats dans les feuilles des plantes stimule la photosynthèse, alors que leur accumulation impacte négativement cette dernière, en inhibant l'ouverture stomatique, la synthèse de la Rubisco, la transcription de nombreux autres gènes impliqués dans les mécanismes photosynthétiques (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003 ; Araya *et al.*, 2006 ; Tholen *et al.*, 2007), et accélère la sénescence foliaire (Wingler and Roitsch, 2008). De plus, l'infestation par *O. cernua* tend à stimuler l'absorption de l'azote chez le tabac (Hibberd *et al.*, 1999). Cela peut être imputable à l'augmentation de la transpiration observée chez l'hôte et donc à l'augmentation du flux de masse transpiratoire transportant l'azote des racines vers les feuilles. En parallèle, le site principal d'assimilation des nitrates passerait des racines aux feuilles chez le tabac infesté (Irving and Cameron, 2009). De même, l'infestation par l'orobanche induit chez les plantes hôtes une diminution de la concentration en aminoacides dans les racines, et celle en conséquence de la quantité d'acides aminés réinjectés dans le xylème (transport cyclique des aminoacides phloème/xylème, tige/racine), ce qui s'opposerait à la régulation négative de l'absorption de l'azote par certains aminoacides (Glass *et al.*, 2002 ; Miller *et al.*, 2007).

De façon intéressante, Hibberd et associés ont démontré chez le tabac que l'effet d'infestations multiples d'orobanches sur un même pied de tabac n'était pas cumulatif (Hibberd *et al.*, 1998). Autrement dit, la taille du pool de ressources disponibles pour le(s) parasite(s) constitue un facteur limitant majeur pour leur développement. Les orobanches fixées sur un même pied se comportent ainsi en compétiteurs face aux ressources de l'hôte.

L'infestation a également un impact sur l'architecture de la plante hôte. Par exemple, le prélèvement de nutriments effectué par *O. minor* sur le trèfle augmente significativement le diamètre des racines se trouvant au-dessus du point de fixation du parasite, alors que celles se

trouvant en-dessous sont significativement plus fines (**Fig. 14D**) (Dale and Press, 1998). Plus globalement, la ponction des nutriments par le parasite, lorsqu'elle est importante, cause une diminution de la biomasse du système racinaire, de la tige et des organes reproducteurs, et donc de la fécondité de la plante hôte (Scholes and Press, 2008). A l'échelle de la parcelle, l'infestation provoque ainsi une perte de rendement pouvant être réellement importante suivant l'espèce ou la variété d'hôte et de parasite et le degré d'infestation, et donc agro-économiquement préjudiciable (Joel *et al.*, 2007 ; Aly, 2007). Il est important de noter que la phase de développement souterrain de l'orobanche est la plus dommageable pour la culture. La capacité d'interception des nutriments par le parasite est toutefois hôte-dépendante et même variété-dépendante pour certaines espèces (Cameron and Seel, 2007 ; Aly, 2007 ; Pérez-de-Luque *et al.*, 2009). Ces différences peuvent être multifactorielles (morphologie de l'hôte, possibilité de développement de l'haustorium, compétition sources-puits, mécanismes de défenses... ; Cameron *et al.*, 2005 ; Irving and Cameron, 2009) et seront en partie détaillées au sein de la partie "mécanismes d'évitement et de résistance à l'orobanche".

- **Notion de spectre d'hôtes**

La très grande diversité des molécules montrant une activité de stimulation de la germination des graines de plantes parasites reflète l'étendu du panel de plantes pouvant être considérées comme plantes hôtes. Cependant, chaque espèce d'orobanche possède son propre spectre d'hôtes et n'est donc pas capable de parasiter toutes les espèces exsudant des stimulants, qui de plus, ne s'avèrent pas toutes être des hôtes potentiels. En effet, certaines espèces, dites "faux-hôtes", induisent la germination des graines du parasite sans permettre leur fixation. Cela suggère donc que le spectre d'hôtes d'une plante parasite peut être conditionné, au moins en partie, par sa capacité à répondre aux différents stimulants, de la même façon qu'aux différents HIFs. Toutefois, l'étendue du spectre d'hôtes est très variable, et dépend des stratégies de (co)évolution mises en jeu, certaines espèces étant adaptées à un hôte quasi-unique (*O. hederæa* parasite les *Araliaceae* et quasi uniquement le lierre) alors que d'autres peuvent parasiter une large gamme d'hôtes (*P. ramosa* par exemple, cf. § ci-après ; Parker and Riches, 1993). Néanmoins, il est important de considérer la notion de sélectivité ou de "préférence d'hôte", car des espèces à large spectre pouvant parasiter un grand nombre de plantes gagnent à se fixer sur une plante leur assurant un succès reproducteur optimal. Cette "préférence d'hôte" peut tout simplement être induite évolutivement par la forte abondance d'un hôte représentant ainsi une ressource peu limitée, mais des mécanismes moléculaires peuvent également être impliqués, que ce soit au niveau de l'induction de la germination ou de la mise en place de l'haustorium (HIFs ; Shen *et al.*, 2006).

La capacité qu'ont certaines plantes parasites à pouvoir parasiter un large spectre d'hôtes couplée au phénomène de sélection évolutive induite par l'hôte (comme la présence accrue d'un hôte potentiel) est un des moteurs principaux de l'adaptabilité à de nouvelles espèces (Satovic *et al.*, 2009 ; Thorogood and Hiscock, 2010). C'est le cas de l'orobanche rameuse qui présente un spectre d'hôtes extrêmement large puisqu'il avoisine la centaine d'espèces, dont une bonne partie présentent un intérêt agronomique (Boulet *et al.*, 2001 ; Qasem and Foy, 2007 ; Qasem, 2009). L'adaptabilité de l'orobanche rameuse peut être en partie

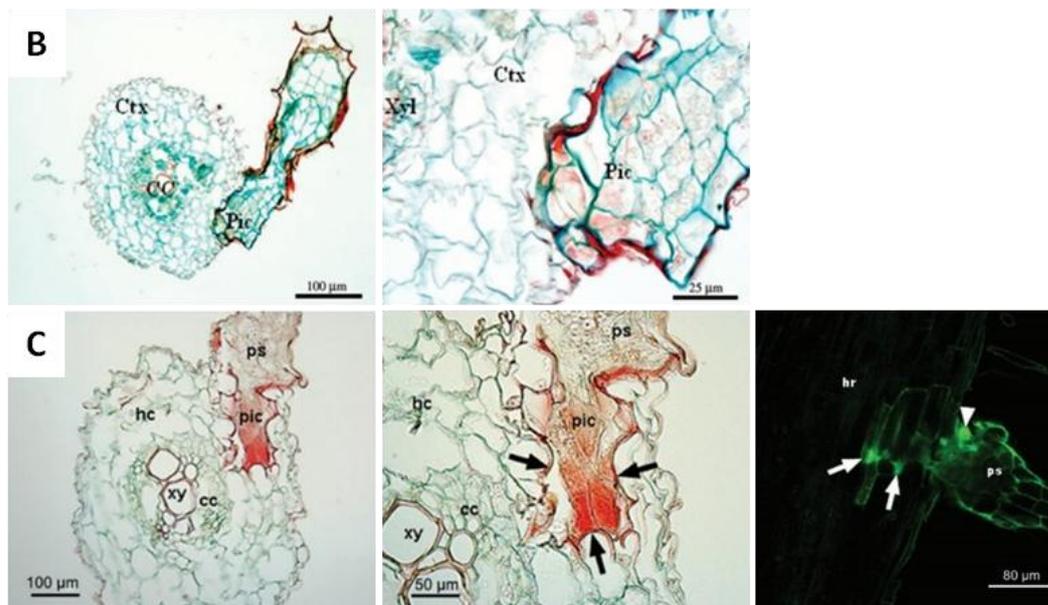
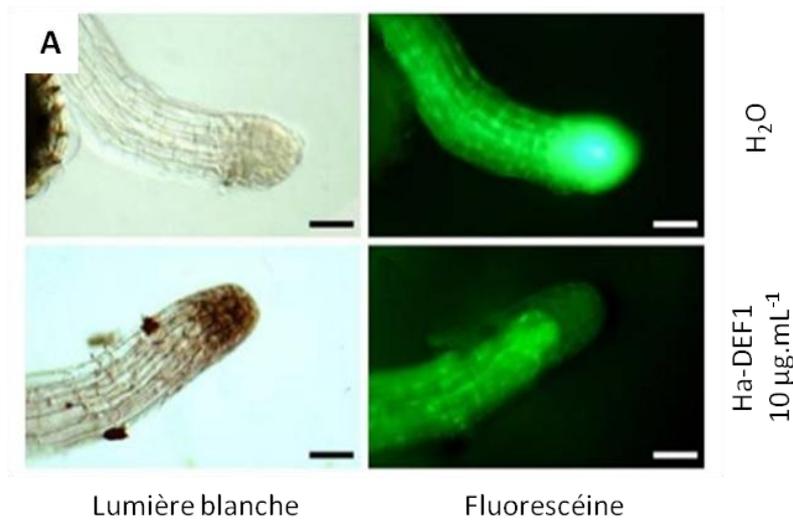


Figure 19 : Mécanismes de résistances à l'orobanche

Hr, racine hôte ; Ctx et hc, cortex racinaire ; CC, cylindre central ; Xy, xy et Hv, xylème de l'hôte ; Pic, cellules intrusives du parasite ; ps, radicule du parasite ; s, hampe du parasite ; t, tégument de la graine d'orobanche ; tu, tubercule d'orobanche

A : effet d'une défensine d'un génotype résistant d'*H. annuus* (Ha-DEF1) sur la radicule de *P. ramosa* (la fluorescéine est un colorant vital) (échelle = 50 µm) (Zélicourt *et al.*, 2007)

B : accumulation de pectines (en rouge) dans les parois des cellules du cortex racinaire d'un génotype *Pisum sativum* résistant à *O. crenata* (Pérez-de-Luque, 2006a)

C : accumulation de composés phénoliques de type subérine dans les cellules du cortex racinaire d'un génotype d'*H. annuus* résistant à *O. cumana*

due à la sélection rapide de nouveaux stimulants de germination ou HIFs produits par les hôtes disponibles (Jamison and Yoder, 2001 ; Qasem, 2009), mais également à sa capacité à contourner les mécanismes de défense de l'hôte, comme c'est le cas pour les différentes races d'*O. cumana* (Echevarria-Zomeno *et al.*, 2006). D'un point de vue populationnel, le mode de reproduction majoritairement autogame joue également un rôle vis-à-vis de la capacité d'adaptation à de nouvelles espèces hôtes puisqu'il promeut la fixation de mutations et de différenciations génétiques (Brault *et al.*, 2007).

1.4. Mécanismes d'évitement et de résistance à l'orobanche

Les orobanches sont un fléau agro-économique pour un grand nombre de pays entourant le bassin méditerranéen. Avant toute tentative de développement de méthodes de lutte, il est primordial d'identifier et de comprendre les mécanismes de résistance existants (par l'utilisation de plante hôte modèle la plupart du temps), afin d'obtenir une vue d'ensemble de l'interaction, et ainsi d'orienter les processus de sélections variétales en vue de l'obtention de variétés résistantes (Pérez-de-Luque *et al.*, 2009). La notion de résistance à l'orobanche n'implique pas seulement la résistance totale au parasite (absence ou faible développement de l'orobanche ayant un impact négligeable sur l'hôte), mais également tout un panel de degrés de résistance mettant en jeu de mécanismes d'évitement (du contact ou de la connexion au système vasculaire) ou de défense proprement dit.

A l'heure actuelle, aucun processus de Réaction Hypersensible (HR) n'a été observé chez un hôte résistant à l'orobanche (Lozano-Baena *et al.*, 2007). Des mécanismes de résistance horizontaux, impliquant des familles multigéniques identifiées via une approche QTL (Quantitative Trait Loci) sont à l'œuvre (Román *et al.*, 2002 ; Labrousse *et al.*, 2004). Ils peuvent avoir lieu au sein de différentes étapes du cycle de développement du parasite.

La stimulation de la germination des graines de plantes parasites étant une étape clef de leur cycle de vie, un pan important de recherche et de sélection consiste à développer des variétés peu stimulantes (faible exsudation de stimulants ou exsudation d'inhibiteurs de la germination). Ainsi, un grand nombre de screening de germplasmes a été effectué chez plusieurs plantes d'intérêt agronomique, comme la fève (Abbes *et al.*, 2007), le pois (Rubiales *et al.*, 2003), la vesce (Fernández-Aparicio *et al.*, 2009), la lentille (Fernández-Aparicio, 2008), le tournesol (Labrousse *et al.*, 2001) ou le colza (Sobrino-Vesperinas, 1985 ; Zehhar *et al.*, 2003 ; Gauthier *et al.*, 2012) afin d'identifier des fonds génétiques propices à la sélection de variétés peu stimulantes.

Des études ont également été réalisées afin d'identifier des molécules de défense des plantes ayant un impact sur l'orobanche. Ainsi, il a été démontré que des molécules de types composés phénoliques (coumarines, acide gallique...), flavonoïdes (naringénine...), phytoalexines ou peptides (défensines...), exsudées par le système racinaire de plantes d'intérêt agronomique, pouvaient provoquer la nécrose de radicule d'orobanches avant leur pénétration dans le cylindre central de la racine hôte (**Fig. 19A** ; Serghini *et al.*, 2001 ; Pérez-de-Luque *et al.*, 2005 ; Echevarria-Zomeno *et al.*, 2006 ; Zélicourt *et al.*, 2007 ; Mabrouk *et al.*, 2007).

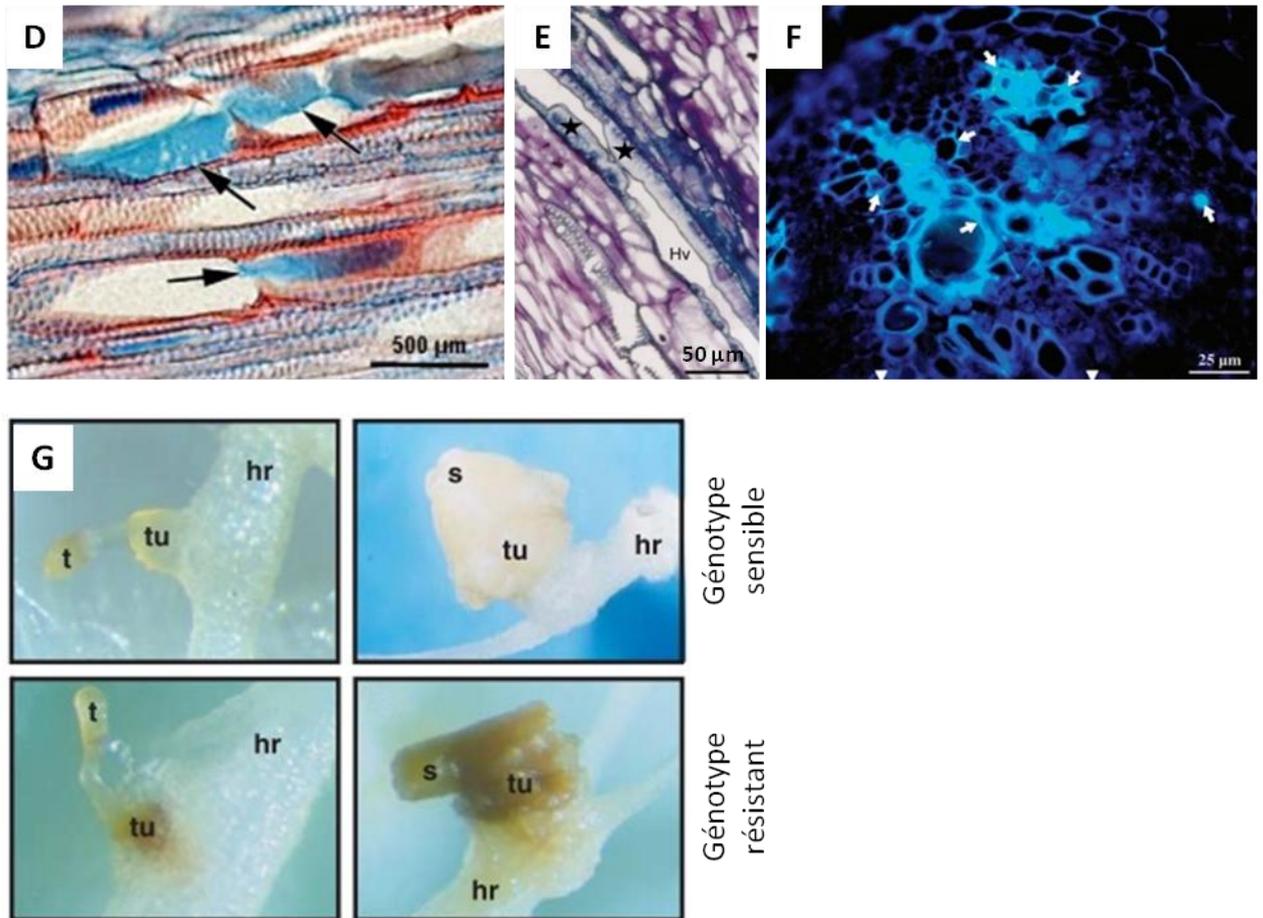


Figure 19 : Mécanismes de résistances à l'orobanche

Hr, racine hôte ; Ctx et hc, cortex racinaire ; CC, cylindre central ; Xy, xy et Hv, xylème de l'hôte ; Pic, cellules intrusives du parasite ; ps, radicule du parasite ; s, hampe du parasite ; t, tégument de la graine d'orobanche ; tu, tubercule d'orobanche

D : accumulation de mucilage (en bleu) dans les vaisseaux xylémiens d'un génotype de *Vicia sativa* résistant à *O. crenata* (Pérez-de-Luque *et al.*, 2008)

E : coupe de racine d'un génotype d'*H. annuus* résistant à *O. cumana* montrant l'obstruction de vaisseaux xylémiens par des substances gélifiantes (étoiles) (Labrousse *et al.*, 2001)

F : dépôt de callose (flèches) dans les parois du parenchyme et des vaisseaux xylémiens chez un génotype de *Vicia sativa* résistant à *O. crenata* (Pérez-de-Luque, 2006b)

G : nécroses de tubercules d'*O. cumana* fixés sur un génotype résistant d'*H. annuus* (Letousey *et al.*, 2007)

D'autres formes de résistances pré-haustoriales ont également été démontrées et sont pour la plupart basées sur des mécanismes de renforcement pariétaux empêchant la pénétration de la radicule du parasite (**Fig. 19B et C**). Des travaux ont démontré le développement de réseaux protéiques, des dépôts de callose, ou l'accumulation de subérine ou de lignines (Pérez-de-Luque *et al.*, 2005 ; Pérez-de-Luque, 2006a ; Echevarria-Zomeno *et al.*, 2006 ; Mabrouk *et al.*, 2010).

Enfin, il existe des formes de résistances mises en place chez l'hôte après la fixation et la connexion du parasite au système vasculaire (résistances post-haustoriales), tels que des systèmes d'obstruction des faisceaux vasculaires par l'accumulation de substances gélifiantes telles que le mucilage (**Fig. 19D et E**) ou des dépôts de callose (**Fig. 19F**) chez la vesce, la tomate et le tournesol, provoquant la plupart du temps la nécrose des tubercules d'orobanche (**Fig. 19G** ; El Halmouch, 2004 ; Pérez-de-Luque, 2006b ; Letousey *et al.*, 2007). Certains schémas d'allocation du carbone au sein de l'interaction semblent également défavorables au développement du parasite, lorsque la compétition sources/puits hôte - parasite se fait en faveur de l'hôte (Labrousse *et al.*, 2010).

Toutefois, il faut garder à l'esprit que les mécanismes de résistance, peuvent être contournés par de nouvelles populations ou races d'orobanches, comme c'est le cas depuis plusieurs décennies dans la lutte opposant les sélectionneurs de tournesol à *O. cumana* (Echevarria-Zomeno *et al.*, 2006 ; Molinero-Ruiz *et al.*, 2009).

- **Sélection de résistances face à l'orobanche**

Les formes de résistances détectées et sélectionnées à ce jour sont plus aptes à maintenir le rendement de la culture plutôt qu'à contrer l'association parasitaire. Ainsi, les efforts d'amélioration génétique sont majoritairement centrés sur l'évaluation des sources de performances au sein de germplasmes capables d'induire le maintien d'une productivité acceptable au sein de sols infestés (on parle dans ce cas de tolérance), mais également d'induire une réduction de l'infestation (on parle dans ce cas de résistance). Contrairement à la sélection de gènes de défense menant à la mise en place de résistances verticales protégeant efficacement la culture mais facilement contournables, l'identification et la sélection de gènes de maintenance, menant à la mise en place de résistances et tolérances horizontales s'avère plus complexe, bien qu'elles permettent l'édification de protection, certes moins dommageable pour le parasite, mais plus robuste à long-terme (Pérez-Vich *et al.*, 2013). Ces formes de résistances interviennent tout au long du cycle ontogénétique du parasite (cf. § précédent).

Chez la plupart des espèces hôtes de l'orobanche, seuls des degrés de résistances modérés à faibles ont été identifiés. Ils impliquent des mécanismes de contrôle polygéniques horizontaux (non-race spécifiques) faiblement héréditaires et fortement influencés par l'environnement, faisant intervenir plusieurs QTL et donc plusieurs mécanismes d'évitement ou de résistance (Román *et al.*, 2002 ; Valderrama *et al.*, 2004 ; Rubiales *et al.*, 2006 ; Díaz-Ruiz *et al.*, 2009). C'est le cas chez un certain nombre de légumineuses telles que la fève (Sillero *et al.*, 2010 ; Fernández-Aparicio *et al.*, 2012), la vesce (Fernández-Aparicio *et al.*, 2009) et le pois

(Rubiales *et al.*, 2006), mais également chez la tomate (Qasem and Kasrawi, 1995), le tabac (Buschmann *et al.*, 2005), le persil (Goldwasser and Kleifeld, 2002) et le colza (Zehhar *et al.*, 2003). Deux études rapportent toutefois la mise en lumière de génotypes présentant de hauts degrés de résistance à l'orobanche, chez la carotte (Zehhar *et al.*, 2003) et la tomate (Dor *et al.*, 2009), ce dernier cas étant dû à une déficience en SLs contrôlée par un seul locus et inhibant ainsi la capacité de ce génotype à induire la germination des graines d'orobanche (Koltai *et al.*, 2010 ; Dor *et al.*, 2011b).

À l'inverse, l'interaction tournesol - *O. cumana* est caractérisée par l'existence de résistances verticales (qualitative, complète et race-spécifique) contrôlées par les allèles dominants du gène *Or* (Vrânceanu *et al.*, 1980). Le contournement rapide et successif de ces résistances a mené à la mise au point de nouvelles variétés et à l'émergence de races d'*O. cumana*, les gènes *Or1* à *Or5* conférant respectivement une résistance aux races A à E (Fernández-Martínez *et al.*, 2008, 2010, 2012). À l'heure actuelle, la nature des gènes *Or1* à *Or5* n'est pas encore clairement définie. *Or5* pourrait en fait être un cluster de gènes de résistance reconnaissance-dépendant via une protéine caractérisée par la présence de motif LRR (Leucine Rich Repeat) et par un site de liaison nucléotidique (NBS ; Pérez-Vich *et al.*, 2013) similaire à ceux conférant une résistance aux différentes races de mildiou chez le tournesol (Radwan *et al.*, 2003, 2008). Des lignées de tournesol ont depuis été identifiées comme résistantes à la race F d'*O. cumana*. Cette forme de résistance est déterminée par six QTL induisant des degrés de résistances légers à modérés, qui provoquent la diminution du nombre d'orobanches fixées par plant par la mise en place de barrières physiques prévenant l'intrusion du parasite et la sécrétion de composés toxiques (Echevarria-Zomeno *et al.*, 2006). Des sources de résistances horizontales à *O. cumana* ont également été identifiées chez le tournesol (cf. § "Mécanismes d'évitement et de résistance à l'orobanche"). La sélection s'oriente actuellement vers la combinaison de résistances verticales et horizontales pour le développement de résistances plus durables.

- **Autres méthodes disponibles pour lutter contre l'orobanche**

La lutte contre l'orobanche en tant que phytopathogène de grandes cultures est problématique du fait de la complexité des interactions plantes hôtes - plantes parasites. Les stratégies évolutives développées au sein de leur cycle de vie, comme la production d'une très grande quantité de graines minuscules à la longévité importante, rendent la mise au point d'itinéraires culturaux complexe. L'utilisation de produits phytosanitaires spécifiques du pathogène est pour l'instant impossible puisqu'aucune particularité métabolique des orobanches n'a permis de développer un herbicide sélectif. À l'heure actuelle, les agriculteurs ne disposent d'aucune méthode de lutte unique réellement efficace et durable. Seule une combinaison de méthodes de contrôle permet de réduire l'impact du parasite et de freiner la dissémination de ses graines, voire de diminuer la taille de sa population. Ces stratégies de lutte intégrée rassemblent aussi bien des méthodes préventives et des techniques culturales, que des méthodes de luttés physiques, génétiques, chimiques ou biologiques.

Méthodes préventives

Puisqu'aucune méthode unique de lutte n'est disponible à l'heure actuelle, il est primordial de limiter au maximum la dispersion et l'introduction des graines d'orobanches en appliquant un ensemble de règles ayant prouvées leur efficacité au sein de programme de lutte contre d'autres pathogènes. Tout d'abord, l'utilisation de lots de semences non contaminés ou certifiés est nécessaire afin de ne pas introduire l'orobanche dans de nouvelles parcelles ou de ne pas augmenter le potentiel infectieux de parcelles déjà contaminées. Une méthode de quantification de la teneur d'un lot de semence en graines d'orobanches a été développée, et permet de discriminer les principales espèces phytopathogènes d'orobanche (Dongo *et al.*, 2011). Ensuite, il est important de limiter au maximum l'utilisation de pailles infestées et des fumiers qui en découlent, puisqu'ils sont par la suite épandus sur d'autres parcelles. La mise en place de processus de fermentation de ces fumiers permet de limiter l'infestation (perte de viabilité des graines du fait de la hausse de température et de l'exposition à des composés toxiques issus de la fermentation; Abu-Irmaileh and Abu-Rayyan, 2006). De la même manière, il est conseillé de ne pas faire pâturer d'animaux provenant d'une parcelle infestée dans une parcelle non-infestée. Une attention particulière doit également être portée sur le nettoyage du matériel agricole suite à son utilisation dans une parcelle infestée, ainsi que l'entretien des bords de parcelles car certaines adventices peuvent servir d'hôtes à l'orobanche (Boulet *et al.*, 2001, 2007 ; Gibot-Leclerc *et al.*, 2003). Enfin, certains pays comme l'Australie ont mis en place des zones de quarantaine et un programme d'éradication de l'orobanche rameuse (Jupp *et al.*, 2002 ; Secomb *et al.*, 2006).

Méthodes de culture

Afin de prévenir la multiplication du parasite voire de diminuer les stocks grainiers, il est conseillé d'effectuer des rotations longues avec des espèces non-hôtes, faux-hôtes et des plantes pièges. Les plantes faux-hôtes induisent la germination des graines du parasite sans permettre leur fixation, on parle aussi de germinations suicides. Les plantes pièges sont par contre des hôtes privilégiés de l'orobanche (forte stimulation de la germination et nombreuses fixations) qui sont soit détruites mécaniquement, soit utilisées comme engrais vert par enfouissement direct ou post-gelées et ce avant floraison du parasite (Gibot-Leclerc *et al.*, 2003 ; Qasem and Foy, 2007). Il est également possible d'utiliser en association des plantes allélopathiques exsudant des composés inhibiteurs de la germination des graines d'orobanches (Evidente *et al.*, 2007 ; Khan *et al.*, 2008 ; Shrif *et al.*, 2013 ; Pickett *et al.*, 2013). L'emploi de variétés résistantes au sein de ces rotations est une des stratégies de lutte à long terme les plus prometteuses, dont il ne faut toutefois pas surestimer la portée puisque de nombreux exemples de contournement de résistance ont été observés (cf. § "Sélection de résistances face à l'orobanche").

Parallèlement, il est envisageable d'effectuer un décalage des semis de façon à obtenir des conditions environnementales moins favorables au développement du parasite (Castejon-Muñoz *et al.*, 1993). L'enfouissement des graines de parasite est également possible grâce à un labour profond, ce qui limite la portion de sol infesté en contact avec les racines de plantes hôtes. La fertilisation des sols permet de plus de réduire le taux d'infestation (Haidar *et al.*,

2003), d'une part car la nutrition azotée et phosphatée altère la production ou l'exsudation de stimulants de germination (Yoneyama *et al.*, 2001, 2007*b,a*, 2012), et d'autre part car la fertilisation tendrait à renforcer la force de puits de l'apex caulinaire de la plante hôte, et modifierait ainsi l'allocation des nutriments au profit de l'hôte (Labrousse *et al.*, 2010).

Méthodes destructives physiques

L'arrachage manuel des jeunes tiges d'orobanches reste l'une des techniques efficace face à ce parasite, bien qu'elle intervienne seulement après la période de développement souterrain la plus dommageable pour la culture. Cette méthode, difficilement adaptable aux grandes étendues hautement infestées, permet d'assurer un contrôle de la propagation du parasite sans détruire la culture en place, mais nécessite une importante main d'œuvre (Aly, 2007). D'autres approches, telle que l'inondation, le brulis ou la solarisation ont prouvé leur aptitude à réduire le stock grainier des parcelles infestées (Aly, 2007 ; Boz *et al.*, 2012).

Méthodes de lutte chimique

La fumigation de produits phytotoxiques (bromométhane, métham-sodium, sodium méthyl dithiocarbamate...) a longtemps été utilisée de façon efficace pour détruire les graines d'orobanches présentes dans le sol (Press and Graves, 1995). Toutefois la plupart de ces produits sont maintenant interdits du fait de leurs conséquences environnementales. L'utilisation d'herbicides non-sélectifs systémiques (glyphosate, sulfonilurées, imidazolinones...) avant semis ou avant émergence du parasite a également fait ses preuves (Nandula *et al.*, 2001 ; Haidar *et al.*, 2005 ; Ghannam, 2012). En effet, d'une part les herbicides peuvent agir directement sur les graines enfouies dans le sol, et d'autre part l'orobanche se comportant comme un puits surnuméraire fort, accumule les herbicides phloème-mobiles appliqués sur la plante hôte (Jurado-Expósito *et al.*, 1999). Cependant, il est indispensable de bien connaître le cycle ontogénétique de l'orobanche avant d'effectuer un traitement chimique car l'application doit être réalisée durant les jeunes stades de développement du parasite, et ensuite répétée plusieurs fois, sans toutefois dépasser un certain seuil qui pourrait être dommageable pour la culture. Or, de nombreuses plantes de grande culture s'avèrent relativement sensibles aux produits phytosanitaires utilisés, ce qui nécessite une diminution des doses apportées rendant très variable l'efficacité du traitement sur le parasite. Enfin, la potentialité d'acquisition rapide de résistance aux herbicides par les plantes parasites est à prendre en considération (Gressel, 2013).

Une autre approche chimique consiste à utiliser des molécules synthétiques ayant un impact sur la germination des graines du parasite. Des études ont ainsi démontré que l'application au sol de SLs de synthèse (GR24, Nijmegen 1) ou de dérivés de la fusicoccine pouvaient induire la germination suicide de graines d'orobanches (Wigchert *et al.*, 1999 ; Evidente *et al.*, 2006). Au contraire, l'application d'aminoacides (méthionine principalement) inhibe la germination et perturbe le développement d'orobanches déjà fixées (Vurro *et al.*, 2006). Néanmoins, l'usage de ce type de molécules au champ paraît difficile, d'une part à cause



Figure 20 : Larve de *Smicronyx cyaneus* dans une tige d'*Orobanche teucris* (Höniges, 2009)

du coût évident de ce type de traitements, et d'autre part à cause des conséquences inattendues qu'ils pourraient provoquer au sein de la rhizosphère (Bouwmeester *et al.*, 2007).

Méthodes de lutte biologique

Certains organismes pathogènes spécifiques de l'orobanche dans leur milieu naturel sont potentiellement utilisables comme auxiliaires de culture biologique. C'est le cas par exemple d'insectes phytophages connus pour s'attaquer aux tiges, aux fleurs et aux capsules fructifères d'orobanches (**Fig. 20**). *Phytomyza orobanchia*, un diptère dont la larve se nourrit exclusivement des tiges et capsules, permet de diminuer significativement la production de graines lorsqu'il est inoculé sur des parcelles infestées où le parasite est en fructification. L'inoculation doit toutefois être répétée continuellement sur plusieurs années pour que l'infestation soit sensiblement réduite (Klein and Kroschel, 2002).

Un grand nombre de champignons phytopathogènes appartenant majoritairement au genre *Fusarium* présente également un intérêt dans la lutte contre l'orobanche. Là encore, l'étape critique de cette méthode de lutte est l'inoculation de la parcelle infestée. Elle conditionne le développement du champignon et rend donc son utilisation complexe et son impact limité (Boari and Vurro, 2004 ; Andolfi *et al.*, 2005 ; Sauerborn *et al.*, 2007 ; Kohlschmid *et al.*, 2009). L'utilisation de mycotoxines extraites de ces champignons pathogènes de l'orobanche (mycoherbicides spécifiques) semble être une solution prometteuse (Cipriani *et al.*, 2009 ; Evidente *et al.*, 2011a).

Certains symbiontes bactériens et fongiques induisent une meilleure résistance de la plante hôte à l'orobanche. En effet, ils auraient un impact direct ou indirect sur l'exsudation de stimulants ou d'inhibiteurs de la germination des graines de plantes parasites, mais également sur le développement de l'orobanche (Mabrouk *et al.*, 2007 ; Louarn *et al.*, 2012).

Enfin, l'utilisation de Stimulateurs de Défense Naturels (SDN) comme le BTH ou l'ASM semble également être un apport potentiellement utile dans la lutte contre l'orobanche (Gonsior *et al.*, 2004; Kusumoto *et al.*, 2007 ; Véronési *et al.*, 2009).

Apport des biotechnologiques dans la lutte contre l'orobanche

Outre la mise au point de nouvelles variétés résistantes par le biais de processus de sélection, l'innovation technologique actuelle permet de générer par transgénèse des variétés dotées de mécanismes de résistance à l'orobanche. Une des optiques envisagées consiste à amplifier un caractère de résistance déjà identifié. Ainsi, la faible capacité d'induction de la germination de graines d'orobanche a été vérifiée chez des pois transgéniques produisant moins de SLs (Gomez-Roldan *et al.*, 2008). A l'inverse, la génération de variétés surproduisant des stimulants de germination pourrait permettre l'obtention de plantes faux-hôtes (López-Ráez *et al.*, 2009).

Une autre stratégie consiste à introduire dans le génome de la plante hôte un nouveau mécanisme de résistance. De cette façon, Aly et collaborateurs ont développé des lignées de tomate surproduisant une sarcotoxine connue pour son activité antimicrobienne (Aly *et al.*, 2005), ainsi que des lignées de tomate produisant un siRNA (utilisé pour l'ARN silencing) anti ARN-M6PR (Mannose 6-phosphate réductase, gène clef de biosynthèse du mannitol chez l'orobanche ; Delavault *et al.*, 2002 ; Aly *et al.*, 2009). Ces lignées transgéniques ont montré une forte capacité à inhiber le développement d'orobanches fixées ou à provoquer la nécrose des tubercules.

Plusieurs études ont également permis de développer des variétés transgéniques résistantes aux herbicides dans l'optique de simplifier la lutte contre les adventices, dont l'orobanche fait partie (Joel *et al.*, 1995 ; Surov *et al.*, 1998 ; Slavov *et al.*, 2005 ; Gressel, 2009). D'autres procédés de mutagénèse, permettant de générer des résistances chez une plante d'intérêt sans passer par l'étape de transgénèse, ont été utilisés dans cette même optique, les hybrides issus de la technologie Clearfield® en étant un exemple actuellement commercialisé (Tan *et al.*, 2005).

Des travaux basés sur l'utilisation de procédés de mutagénèse ont également permis de générer une lignée de tomate résistante à l'orobanche (par mutagénèse chimique ; Dor *et al.*, 2009, 2011a) et des lignées mutantes de fèves montrant des sensibilités variables face à l'orobanche (par irradiation ; Mejri *et al.*, 2012). Enfin, Pérez-de-Luque et Rubiales proposent d'utiliser les outils offerts par les nanotechnologies pour développer des nanosystèmes ou des nanotransporteurs capables d'adresser des composés toxiques spécifiquement à l'orobanche (Pérez-de-Luque and Rubiales, 2009).

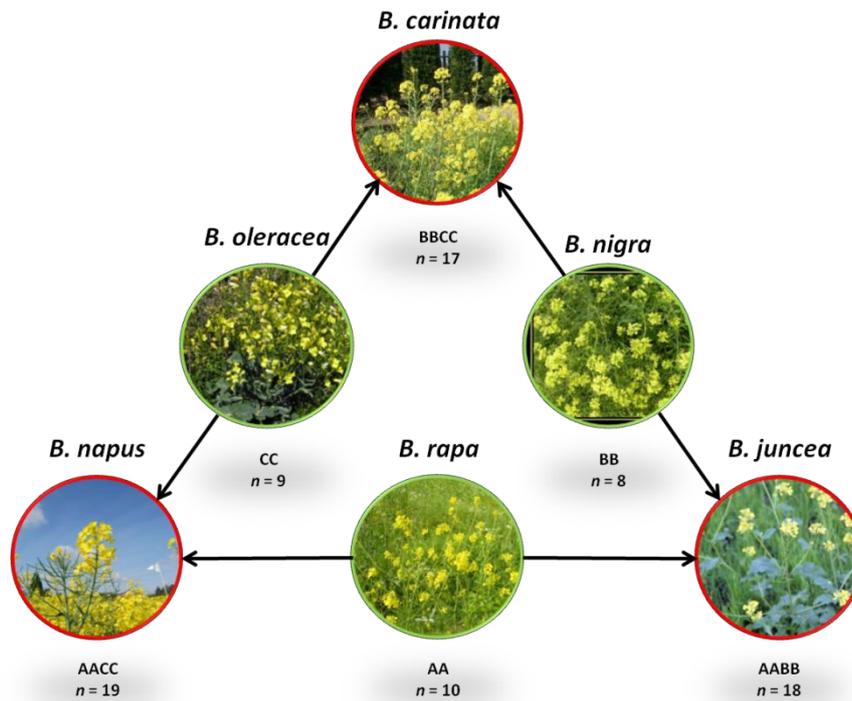


Figure 21 : Le triangle de U (U Nagaharu, 1935 ; d'après Wagner 2012)
Évènements d'hybridation interspécifiques ayant abouti à la formation de nouvelles espèces au sein du genre *Brassica*.

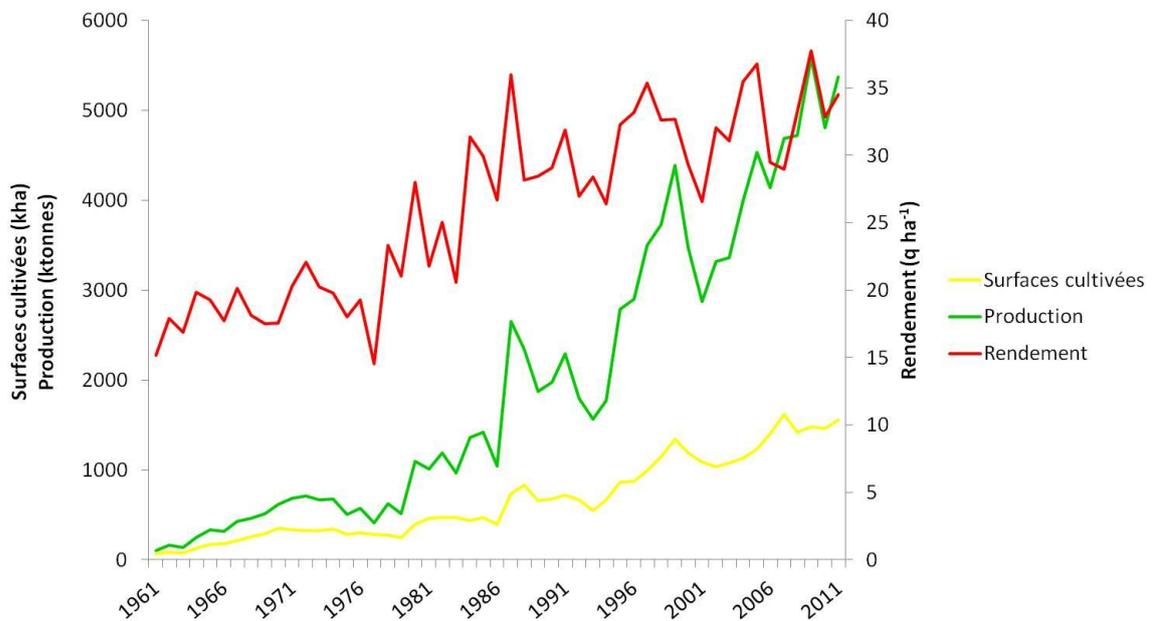


Figure 22 : Évolution de la culture du colza en France entre 1961 et 2011 (FAOSTAT)

2 Le colza (*Brassica napus* L.), espèce d'intérêt agronomique

2.1. Généralités

Le colza *Brassica napus* L., est une plante herbacée semi-autogame (≈ 20 % de pollinisation croisée, Canola Council 2010) à fleurs jaunes de la famille des *Brassicaceae* (ex-Crucifères). Cette grande famille compte 3710 espèces réparties en 338 genres (APG III) et regroupe des plantes d'intérêt agronomique, telles que les choux (*B. oleracea* aux nombreuses variétés), les navets et navettes (*B. rapa* aux nombreuses variétés et sous espèces) et les moutardes (*B. assyriaca*, *B. hirta*, *B. nigra*, *B. carinata*, *B. juncea* et ses nombreuses variétés), mais aussi des plantes d'intérêt scientifique, telles qu'*Arabidopsis thaliana* ou *Thlaspi* spp.. Cette famille est caractérisée par des hybridations interspécifiques entre génomes diploïdes, à l'origine de la formation d'espèces allopolyploïdes. C'est le cas de *B. napus*, les colza et rutabaga (génome AACC, $2n = 38$), de *B. juncea*, la moutarde brune (génome AABB, $2n = 36$) et *B. carinata*, la moutarde d'Abyssinie (génome BBCC, $2n = 34$) qui sont issus d'hybridations entre les espèces *B. rapa* (génome AA, $2n = 20$), *B. nigra* (génome BB, $2n = 16$) et *B. oleracea* (génome CC, $2n = 18$). Le Triangle de U (**Fig. 21**) représente classiquement ces événements d'hybridations (U Nagaharu, 1935).

On distingue deux types de colza, préférentiellement utilisés en fonction des latitudes. Le colza de printemps, semé en fin d'hiver et ayant un cycle court, est plus adapté aux régions du globe à hiver rigoureux, comme le Canada ou l'Europe de l'Est. Le colza d'hiver est, quant à lui, plus acclimaté aux régions tempérées à hiver doux, comme l'Europe de l'Ouest. Les semis étant réalisés en fin d'été, les plants passent l'hiver sous forme de rosettes et reprennent leur cycle végétatif au printemps suivant. Cette étape de vernalisation est d'ailleurs nécessaire à l'induction de la floraison. Le colza d'hiver, prédominant en France, présente de nombreux avantages agronomiques. Du fait de sa forte capacité d'absorption des nitrates à l'automne (Lainé *et al.*, 1993), cette culture permet de limiter la lixiviation hivernale d'azote minéral (on parle de plante "piège à nitrate") et participe donc à la préservation de la qualité des nappes phréatiques et des cours d'eau. La présence du colza 10 mois sur 12 prévient de plus l'érosion des sols. L'architecture pivotante de son système racinaire contribue également à une meilleure structuration des sols, avantage indéniable lors de rotation de cultures avec des céréales, au sein desquelles il permet de plus une rupture des cycles d'adventices et de phytopathogènes. A ces avantages s'ajoute un effet de biofumigation des produits de décomposition des résidus de culture de colza riches en glucosinolates (activité antifongique des isothiocyanates). Enfin, le rendement moyen des génotypes d'hiver est supérieur à celui des génotypes d'été.

Toutefois, le rendement d'une culture n'est pas uniquement dépendant du génotype, mais également conditionné par les conditions pédoclimatiques et les pratiques culturales (travail du sol, intrants...). Ainsi, les rendements obtenus au Canada par le biais de cultures extensives de colza de printemps ($15-20 \text{ q ha}^{-1}$) ne sont pas comparables à ceux obtenus au sein des cultures intensives françaises ($\approx 35 \text{ q ha}^{-1}$). Quoi qu'il en soit, le rendement moyen des cultures de colza a doublé au cours des 50 dernières années (**Fig. 22**) grâce aux travaux

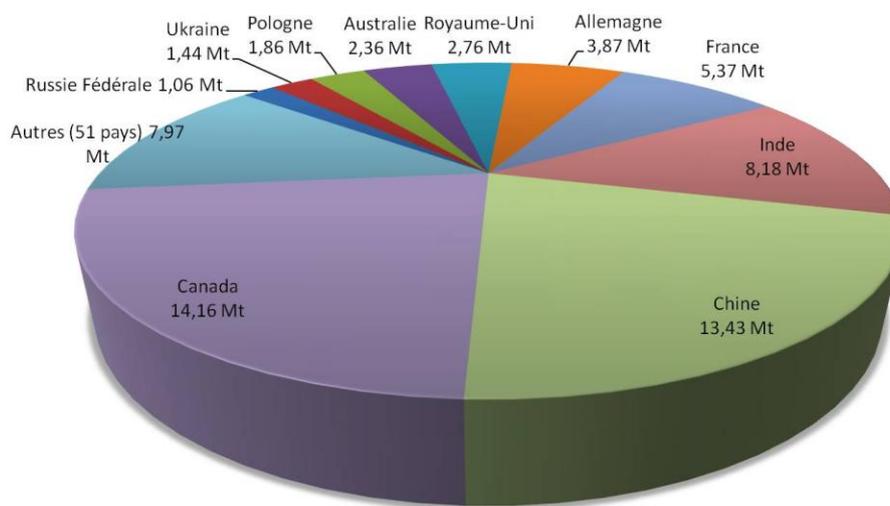


Figure 23 : Principaux pays producteurs de colza en 2011 (en millions de tonnes de graines; FAOSTAT)

d'amélioration variétale et aux avancées des techniques de cultures (itinéraires culturaux, fertilisation, maîtrise des organismes nuisibles et des agents pathogènes). En France, le rendement moyen de ces 10 dernières années oscille autour de 33 q ha⁻¹ avec un rendement record de 37,5 q ha⁻¹ en 2009 (FAOSTAT).

Le colza est principalement cultivé pour ses graines qui contiennent entre 40 et 45 % d'huile (Brennan *et al.*, 2000), ce qui en fait une des quatre principales espèces oléagineuses cultivées avec le soja, le palmier à huile et le tournesol. L'huile de colza présente l'avantage d'être naturellement riche en acides gras insaturés, essentiellement en acides oléique (C18:1 ≈60 %), linoléique (C18:2 ≈20 %) et α -linoléique (C18:3 ≈10 %), ce qui en fait une huile de choix pour la consommation humaine (Vigeolas *et al.*, 2007 ; El-Beltagi and Mohamed, 2010). Les dérivés d'huile de colza sont également valorisés dans des usages industriels variés, tels que des cosmétiques, des plastiques, des adjuvants d'herbicides, des agents anti-mousses ou des agents protecteurs du bois contre les attaques de champignons et d'insectes (Morard *et al.*, 2007). Néanmoins, leur principale application aujourd'hui est le remplacement des produits d'origine fossile par la production de biolubrifiants et de solvants, mais surtout de diester utilisé comme agrocarburant pour les moteurs diésels. En effet, environ 400 000 t d'huile (≈22 % de la production française 2011) sont destinées à cet usage (PROLEA).

La transestérification de l'huile donne un sous-produit, la glycérine végétale, très utilisé en cosmétique et pharmacie. L'extraction de l'huile fournit également un sous-produit, le tourteau de colza (≈55 % de la graine, PROLEA), utilisé couramment dans l'alimentation des ruminants en tant que complément protéique végétal, mais sans toutefois supplanter l'alimentation à base de soja moins coûteuse. Il a l'avantage, comparé aux tourteaux de soja, d'assurer une traçabilité obligatoire dans certaines filières non-OGM de production de viande. Enfin, la plante en elle-même peut être utilisée post-récolte des graines, comme litière ou fourrage.

Le colza est par ailleurs une culture largement répandue à travers le monde. Avec une surface cultivée totale de l'ordre de 33,6 Mha en 2011, elle se plaçait en seconde position des espèces oléagineuses d'intérêt agronomique, après le soja (≈103 Mha ; FAOSTAT). Les principaux pays producteurs sont le Canada, la Chine, l'Inde et l'Europe de l'Ouest. La France, 4^{ème} producteur mondial (**Fig. 23**), reste le premier producteur Européen en termes de surfaces cultivées et de production avec 1,56 Mha et 5,37 Mt de graines en 2011 (FAOSTAT). Ces chiffres sont en constante progression depuis une vingtaine d'années pour répondre aux débouchés alimentaires et industriels (**Fig. 22**). Mais depuis 2008, ce phénomène a encore été accéléré avec l'émergence d'un nouveau débouché, le diester, favorisé par les contextes politiques et économiques. En effet, le protocole de Kyoto, visant à stabiliser les émissions atmosphériques de dioxyde de carbone principalement dues à l'utilisation d'énergies fossiles, a imposé l'incorporation de 5,75 % d'agrocarburants dans les carburants fossiles, chiffre passé à 7 % en France depuis 2010.

Outre l'amélioration des rendements, les programmes de sélection du colza d'hiver ont longtemps été axés sur l'amélioration de caractères nutritionnels, d'hygiène alimentaire et de sécurité sanitaire (composition des graines), et donc intrinsèquement sur la qualité technologique de la graine (adéquation aux processus d'extraction de l'huile), de manière à

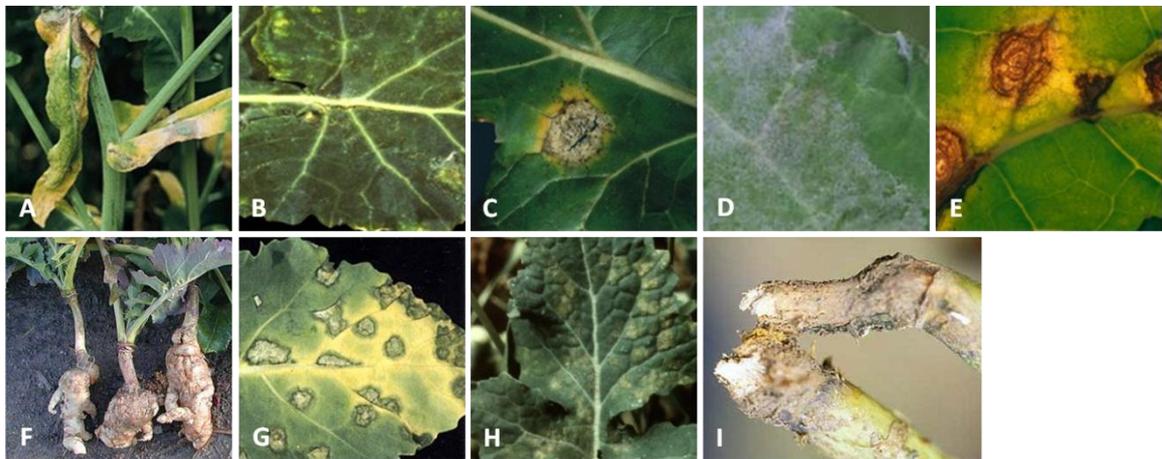


Figure 24 : Principales maladies d'origine fongique du colza (Sources : BASF, BAYER, SYNGENTA)

A : *Sclerotinia sclerotiorum*, **B :** *Cylindrosporium concentricum*, **C :** *Leptosphaeria maculans*

D : *Erysiphe cruciferarum*, **E :** *Alternaria brassicae*, **F :** *Plasmodiophora brassicae*

G : *Pseudocercospora capsellae*, **H :** *Peronospora brassicae*, **I :** *Phytium ultimum*

adapter les caractéristiques de la graine aux utilisations industrielles et aux lois du marché. La première avancée notable fut la mise au point, dans les années 60, de variétés dite "zéro" à très faible teneur en acide érucique (< 1 % des acides gras totaux contre 55 % dans les variétés anciennes), lipide suspecté d'augmenter les risques de maladies cardio-vasculaires (myocardiopathies) chez les animaux (Beare *et al.*, 1963 ; Harvey and Downey, 1964). Ces variétés sont depuis les seules admises pour la consommation humaine (teneur en acide érucique inférieure à 2 % de la fraction lipidique). Une seconde vague de sélection permis alors de développer des variétés dites "double zéro" ou "canola" au Canada, caractérisées par leur faible teneur en acide érucique et en glucosinolates (GLS, $\approx 12-20 \mu\text{mol g}^{-1}$ de graines contre des taux supérieurs à $100 \mu\text{mol g}^{-1}$ dans les variétés anciennes). Les GLS sont des composés soufrés caractéristiques de l'ordre des *Brassicales* dont les produits de dégradation sont goitrigènes et inappétents lorsqu'ils sont incorporés en trop grande quantité dans la ration du bétail (tourteaux) (Papas *et al.*, 1979 ; Bell, 1984). Depuis lors, les objectifs de sélection ont été recentrés autour du développement d'hybrides, dont les performances sont mues par l'effet hétérosis (Diepenbrock, 2000), et qui conditionne pour les agriculteurs un renouvellement annuel des semences (ventes dominantes depuis 2008). Quoi qu'il en soit, même si le rendement et la qualité de la graine restent de mise, les orientations de la recherche et de la sélection variétale sont désormais dictées par les exigences économiques et environnementales (coûts de production, tolérances aux stress biotiques et abiotiques...). L'accroissement de la rentabilité et la préservation de l'environnement par l'ajustement de la fertilisation azotée et l'amélioration de l'efficacité de son utilisation deviennent alors des objectifs majeurs. Nous y reviendrons par la suite.

- **Pathogènes et ravageurs du colza**

Les pathogènes et ravageurs du colza sont fortement dépendants des conditions pédoclimatiques et du stade phénologique de la culture. Ainsi, chaque étape du développement de la plante pourra subir les affres d'un panel spécifique de bioagresseurs, induit par les conditions pédoclimatiques de la parcelle durant cette période.

Un certain nombre de maladies du colza sont provoquées par des champignons phytopathogènes, dont la liste non-exhaustive suivante présente les principaux (**Fig. 24**). La pourriture blanche (*Sclerotinia sclerotiorum*) est une des maladies des feuilles et tiges les plus fréquentes, fortement dommageable au moment de la floraison. La cylindrosporiose (*Cylindrosporium concentricum*) se développe sur les feuilles, tiges et siliques et peut entraîner des pertes de rendement significatives. Le phoma (*Leptosphaeria maculans*) apparaît à l'automne sur les feuilles et le collet des variétés sensibles et provoque de fortes pertes de rendement. L'oïdium (*Erysiphe cruciferarum*) se développe sur les feuilles et tiges lors des printemps chauds et secs. La maladie des tâches noires (*Alternaria brassicae*) se développe sur les feuilles, tiges et siliques et apparaît surtout lorsque le taux d'humidité et la chaleur sont importants. La hernie (*Plasmodiophora brassicae*) est une maladie tellurique affectant le système racinaire en perturbant l'alimentation hydrique et minérale de la plante. Le pseudocercosporiose (*Pseudocercospora capsellae*) provoque des pertes significatives de rendement lorsqu'il se développe fortement sur les siliques. Le mildiou (*Peronospora brassicae*)

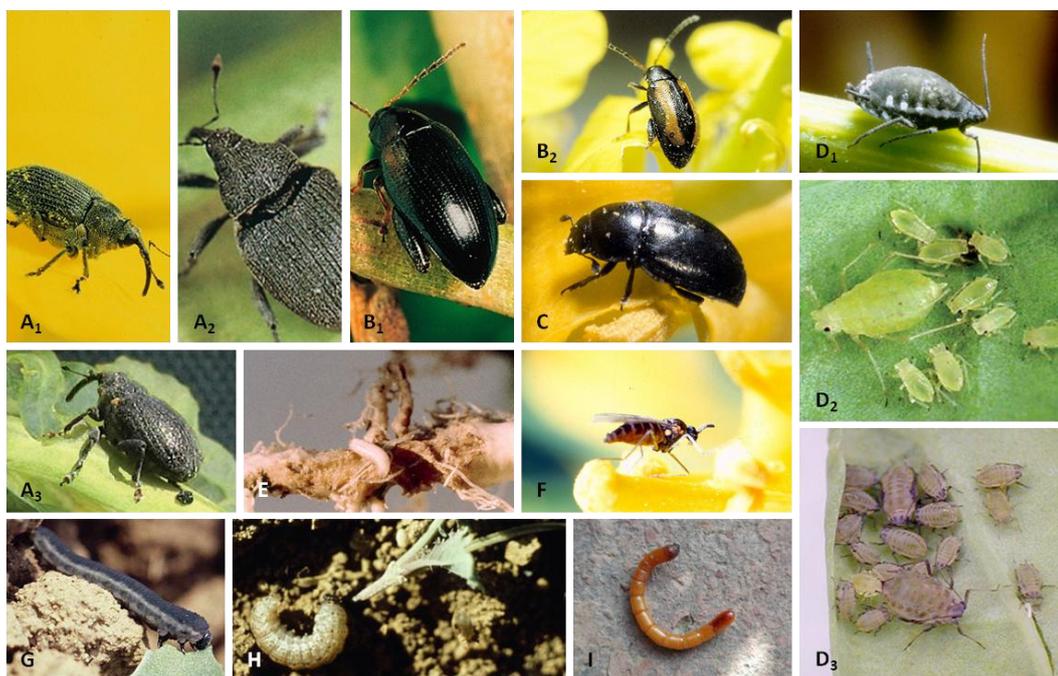


Figure 25 : Principaux ravageurs insectes du colza (Sources : BASF, BAYER, SYNGENTA)

- A** : charançons des siliques (A₁, *Ceutorhynchus assimilis*), des tiges (A₂, *Ceutorhynchus napi*) et de l'apex (A₃, *Ceutorhynchus pictaris*)
- B** : grosse (B₁, *Psylliodes chrysocephala*) et petite (B₂, *Phyllotreta nemorum*) altises
- C** : mélégièthes (*Meligethes aeneus*)
- D** : pucerons cendré du chou (D₁, *Brevicoryne brassicae*), vert du pêcher (D₂, *Myzus persicae*) et du navet (D₃, *Lipaphis erysimi*)
- E** : mouche du chou (*Delia radicum*)
- F** : cécidomyie des crucifères (*Dasineura brassicae*)
- G** : fausse chenille de tenthrède de la rave (*Athalia rosae*)
- H** : chenilles de noctuelles terricoles (*Agrotis segetum* et *Agrotis ipsilon* principalement)
- I** : taupins (*Agriotes* spp. et *Athous* spp. principalement)

se manifeste lors d'automne chaud et humide et peut entraîner la destruction des cotylédons. La fonte des semis provoquée par *Phytophthora ultimum* apparaît au moment de la levée des plantules et peut entraîner leur dessèchement. L'utilisation de traitements phytosanitaires antifongiques reste un des moyens de lutte les plus efficaces à condition qu'elle soit réalisée de façon préventive ou appropriée durant les phases de contamination. Un ensemble de mesures de prophylaxie est également nécessaire afin de limiter la sur-infestation, favoriser l'épuisement de l'inoculum et empêcher la contamination de parcelles adjacentes (broyage et enfouissement des résidus de colza, rotation avec des espèces résistantes ou incompatibles...). De plus, de réels progrès ont été réalisés en termes d'amélioration variétale avec la mise au point de cultivars très peu ou peu sensibles à ces pathogènes.

La culture du colza peut également être endommagée par des ravageurs appartenant au règne animal. Des insectes posent de réels problèmes en France, la liste non-exhaustive suivante présente les principaux (**Fig. 25**). Les charançons (*Ceutorhynchus* spp.) s'attaquent à la tige, aux siliques et au bourgeon terminal suivant les espèces. Leurs larves se développent au sein des organes susnommés en les détruisant plus ou moins, ce qui provoque d'importantes pertes de rendement. Les grosses et petites altises (*Psylliodes chrysocephala* et *Phyllotreta nemorum*, respectivement) sont particulièrement dommageables pour les jeunes plants puisqu'elles s'attaquent aux feuilles et aux tiges. Les larves de grosses altises peuvent également s'attaquer aux pétioles, tiges et bourgeons terminaux. Les méligèthes (*Meligethes aeneus* et *Meligethes viridescens*) provoquent quant à elles la chute prématurée des fleurs en les perforant afin d'atteindre leur pollen. Certains pucerons (*Myzus persicae*, *Brevicoryne brassicae* et *Lipaphis erysimi* principalement) peuvent s'avérer fortement dommageables pour la culture du colza à cause des dégâts directs qu'ils provoquent par piqûres (recroquevillement des feuilles, retard de croissance, mort des jeunes plants ou rosettes...) mais également à cause du miellat et des champignons qui s'en nourrissent, et surtout des virus qu'ils peuvent véhiculer et transmettre (le *Turnip Yellowing Virus* ou TuYV, le *Cauliflower Mosaic Virus* ou CaMV et le *Turnip Mosaic Virus* ou TuMV). La mouche du chou (*Delia radicum*) pose également problème puisque sa larve se nourrit principalement du pivot racinaire et perturbe ainsi l'alimentation hydrique et minérale de la plante. La cécidomyie des crucifères (*Dasineura brassicae*) peut provoquer des pertes de rendement car sa larve se développe dans les siliques. De façon moins fréquente, la fausse chenille de tenthrède de la rave (*Athalia rosae*), peut rapidement conduire à une défoliation complète de la culture au stade rosette. Les chenilles de noctuelles terricoles dites "vers gris" (*Agrotis segetum* et *Agrotis ipsilon* principalement) peuvent également détruire les jeunes plants de colza. Des ravageurs telluriques comme les larves de taupin nommées "vers fil de fer" (*Agriotes* spp. et *Athous* spp. principalement) ou des nématodes (*Meloidogyne artiellia*, *Heterodera cruciferae* et *Heterodera schachtii*) peuvent également poser problème lorsqu'elles s'attaquent aux organes souterrains des jeunes plants. Là encore, des mesures de prophylaxie et de lutte biologique peuvent s'avérer efficaces pour prévenir et lutter contre ces ravageurs, mais lors de fortes attaques, seuls les traitements phytosanitaires ont un impact conséquent.

D'autres animaux, comme les limaces grise et noire (*Arion* spp. et *Deroceras reticulatum*, respectivement) peuvent s'avérer problématiques pour les jeunes plants principalement. Des attaques d'oiseaux et majoritairement de pigeons (*Columba* spp.) peuvent également poser problème à la fin de l'automne lorsque le méristème apical et une trop forte quantité de feuilles sont touchés.



Figure 26 : Quelques adventices fréquentes de la culture de colza

Apiaceae : *Ammi majus* (A), *Daucus carota* (B)

Asteraceae : *Centaurea cyanus* (C), *Matricaria* spp. (D), *Cirsium arvense* (E)

Brassicaceae : *Capsella bursa-pastoris* (F), *Sinapis arvensis* (G)

Euphorbiaceae : *Euphorbia helioscopia* (H), *Mercurialis annua* (I)

Geraniaceae : *Erodium cicutarium* (J), *Geranium dissectum* (K)

Poaceae : *Alopecurus* spp. (L), *Lolium multiflorum* (M)

Rosaceae : *Aphanes arvensis* (N)

Rubiaceae : *Galium aparine* (O)

Plantaginaceae : *Veronica persica* (P)

Orobanchaceae : *Phelipanche ramosa* (Q)

Violaceae : *Viola tricolor* (R)

Enfin, un grand nombre d'adventices présentent une certaine affinité pour les cultures de colza. Leur développement s'effectue de façon antagoniste à celui de la culture d'intérêt puisqu'elles utilisent également l'eau, les sels minéraux et la lumière. Elles peuvent de plus héberger de nombreux ravageurs et transmettre des maladies nuisibles, ou comme c'est le cas pour l'orobanche rameuse, servir de plantes hôtes secondaires (Boulet *et al.*, 2001, 2007 ; Gibot-Leclerc *et al.*, 2003 ; Rathke *et al.*, 2006). Il serait impossible d'en faire une liste exhaustive, l'énumération suivante ne regroupera donc qu'une partie d'entre elles rencontrées fréquemment (**Fig. 26**). Nous citerons donc des *Apiaceae* (*Ammi majus*, *Daucus carota*...), des *Asteraceae* (*Centaurea cyanus*, *Cirsium arvense*, *Matricaria* spp., *Picris echioides*...), des *Brassicaceae* (*Capsella bursa-pastoris*, *Crepis foetida*, *Raphanus raphanistrum*, *Sinapis arvensis*...), des *Caryophyllaceae* (*Stellaria media*...), des *Euphorbiaceae* (*Euphorbia helioscopia*, *Mercurialis annua*...), des *Geraniaceae* (*Erodium cicutarium*, *Geranium dissectum*...), des *Papaveraceae* (*Papaver Rhoeas*...), des *Poaceae* (*Alopecurus* spp., *Avena fatua*, *Lolium multiflorum*., *Triticum aestivum*...), des *Rosaceae* (*Aphanes arvensis*...), des *Rubiaceae* (*Galium aparine*...), des *Plantaginaceae* (*Veronica persica*...), des *Orobanchaceae* (*Phelipanche ramosa*...), des *Violaceae* (*Viola tricolor*...) etc. L'emploi d'herbicides est largement répandu dans les agrosystèmes français pour lutter contre les adventices, mais des techniques culturales ont également fait leurs preuves (faux-semis, décalage des semis, densité et profondeur des semis, désherbage mécanique, cultures associées, rotation de cultures...) ainsi que des méthodes de lutte biologique (insectes phytophages, champignons phytopathogènes...) et semblent voués à une démocratisation certaine pour une diminution des intrants et par conscience environnementale.

- **Cycle ontogénétique du colza**

Le cycle phénologique du colza se décompose en sept étapes bien distinctes, même si certaines se chevauchent : germination/levée (stade A), production de feuilles et formation de la rosette (stades B), extension de la tige (montaison, stades C), développement du bourgeon floral (stades D et E), floraison (stades F), développement des siliques et formation des graines (stades G) (**Fig. 27** ; Sylvester-Bradley and Makepeace, 1985 ; Jung, 1992).

En France, le colza d'hiver est semé fin août – début septembre. La germination *sensu stricto* nécessite environ 60 °CJ (Nykiforuk and Johnson-Flanagan, 1999), auxquels s'ajoute environ 90°CJ avant l'émergence des cotylédons (stade A). Cette étape varie cependant en fonction de la température du sol, de son taux d'hygrométrie et de la position de la graine dans le sol. Le jeune plant se développe alors et met en place une rosette de feuilles (stades Bn, n étant égal au nombre de feuilles) ainsi qu'un pivot racinaire tuberculeux et accumulateur de glucides et de glycoprotéines (VSP = Vegetative Storage Proteins) au moment des premières gelées (Jolivet, 1969 ; Quilleré and Triboi-Blondel, 1988 ; Ali *et al.*, 1998 ; Rossato *et al.*, 2002 ; Noquet *et al.*, 2004). Cette accumulation de réserves conférerait une stabilité thermique et une résistance au stress hydrique nécessaire au passage de l'hiver. Le zéro végétatif du colza étant de 4 °C, la croissance est stoppée durant la période hivernale, où on assiste d'ailleurs à la chute des feuilles basales et à la modification des composés pariétaux foliaires permettant l'augmentation de la plasticité pariétale nécessaire à l'adaptation au stress thermique

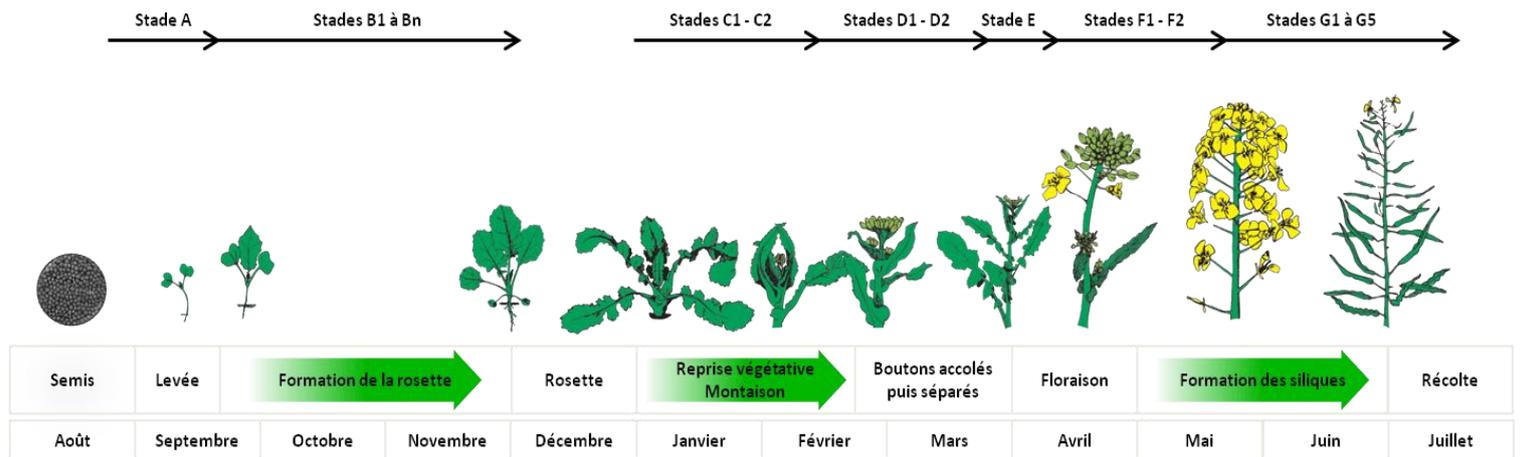


Figure 27 : Stades phénologiques du colza d'hiver selon Jung (Jung, 1992)

Stade A : pas de vraies feuilles, seuls les cotylédons sont visibles

Stades B1 à Bn : formation de la rosette, distinction des étapes au nombre de vraies feuilles étalées ou déployées, entre-nœuds non visibles

Stades C1 et C2 : reprise de végétation et montaison, apparition de jeunes feuilles, entre-nœuds visibles, la tige commence à apparaître (étranglement vert clair à la base des nouveaux pétioles)

Stades D1 et D2 : boutons floraux accolés, au départ cachés par les feuilles terminales (D1), puis l'inflorescence principale se dégage et les inflorescences secondaires deviennent visibles (D2)

Stade E : boutons floraux séparés, allongement des pédoncules inflorescentiels

Stades F1 et F2 : premières fleurs ouvertes (F1), allongement de la hampe florale et nombreuses fleurs ouvertes (F2)

Stades G1 à G5 : chute des premiers pétales, premières siliques inférieures à 2cm, floraison des axes secondaires (G1), allongement des premières siliques jusqu'à 4cm (G2), puis supérieur à 4cm (G3), les premières siliques deviennent bosselées (G4) et les grains se colorent (G5)

(Solecka and Kacperska, 1995 ; Kubacka-Zebalska and Kacperska, 1999). La tolérance au froid, en lien avec l'induction tardive de la floraison, semble être contrôlée par des facteurs génétiques (Kole *et al.*, 2002) et impactée par la fertilisation automnale (Rathke *et al.*, 2006).

La reprise végétative a lieu dès que les moyennes journalières dépassent régulièrement 5 °C, mais est également fortement dépendante de la date de semis (Tittone *et al.*, 1988). Les réserves carbonées et azotées du pivot racinaire sont alors remobilisées pour la formation de nouvelles feuilles (Quilleré and Triboï-Blondel, 1988). La croissance printanière est caractérisée par une forte production foliaire nécessaire à l'augmentation de la surface photosynthétique, et par l'allongement (montaison, stades C1 et C2) et la ramification de la tige. La tige en question va ainsi croître et se ramifier jusqu'à la fin de la floraison. On assiste parallèlement à une modification de la morphologie foliaire puisque des stipules apparaissent à la base des feuilles nouvellement formées.

Suite à la vernalisation dont la durée est dépendante de la température, de l'héméroperiode et de l'âge de la plante (Leterme, 1988), des modifications transcriptionnelles et hormonales principalement gibbérélines-dépendantes (Ausin *et al.*, 2005 ; Irish, 2010 ; Lee and Lee, 2010 ; Dorca-Fornell *et al.*, 2011) vont entraîner la transformation du méristème apical émetteur de feuilles, en un dôme chargé de primordia floraux (stades D1, D2 et E). Il en est de même pour les bourgeons axillaires qui apparaissent à l'aisselle des feuilles sur la tige principale, et qui donneront ultérieurement l'aspect buissonnant caractéristique du colza.

L'induction de la floraison est effectuée en réponse à l'allongement de l'héméroperiode et à des facteurs génétiques propres aux cultivars (précoces ou tardifs ; Kole *et al.*, 2002). C'est en début de floraison que le nombre potentiel de siliques, défini par le nombre d'inflorescences apparues, est déterminé par la biomasse produite pendant la montaison (Habekotté, 1993). La transition phase végétative/phase reproductrice constitue donc chez le colza l'étape la plus critique du cycle ontogénétique pour l'élaboration du rendement. La floraison s'échelonne sur 4 à 6 semaines, entre avril et mai en France (stades F1, F2, G1, G2 et G3), en débutant par l'inflorescence principale suivie des ramifications. L'inflorescence étant indéfinie, l'ouverture des fleurs s'effectue de manière basifuge. Sur cette période, on note une diminution de la surface foliaire, le couvert provoqué par l'inflorescence diminuant considérablement la pénétration des rayons solaires, cela entraîne une réduction de l'activité photosynthétique (Thurling, 1974).

Consécutivement à la fécondation, on assiste, en parallèle de la floraison, à la formation des siliques de façon également basifuge. Les parois des siliques étant chlorophylliennes, elles subviennent en partie à leurs besoins en carbone. Toutefois, une importante remobilisation des composés carbonés, azotés et soufrés s'opère également, en provenance des feuilles sénescentes (Rossato *et al.*, 2001 ; Malagoli *et al.*, 2005 ; Gombert *et al.*, 2006 ; Desclos *et al.*, 2009 ; Dubousset *et al.*, 2009, 2010 ; Abdallah *et al.*, 2010), mais également des tiges qui font office de siège de stockage transitoire de composés carbonés et de VSP (Rossato *et al.*, 2002 ; Noquet *et al.*, 2004). Cette remobilisation conditionne le remplissage des graines. Un nombre de siliques pouvant être important peut potentiellement avorter par manque d'assimilats exportés. L'inflorescence principale produit le plus grand nombre de graines et constitue la composante essentielle du rendement en graines du colza. Les inflorescences secondaires produisent un nombre de graines proportionnel à l'âge de la ramification. Il est conseillé aux agriculteurs de

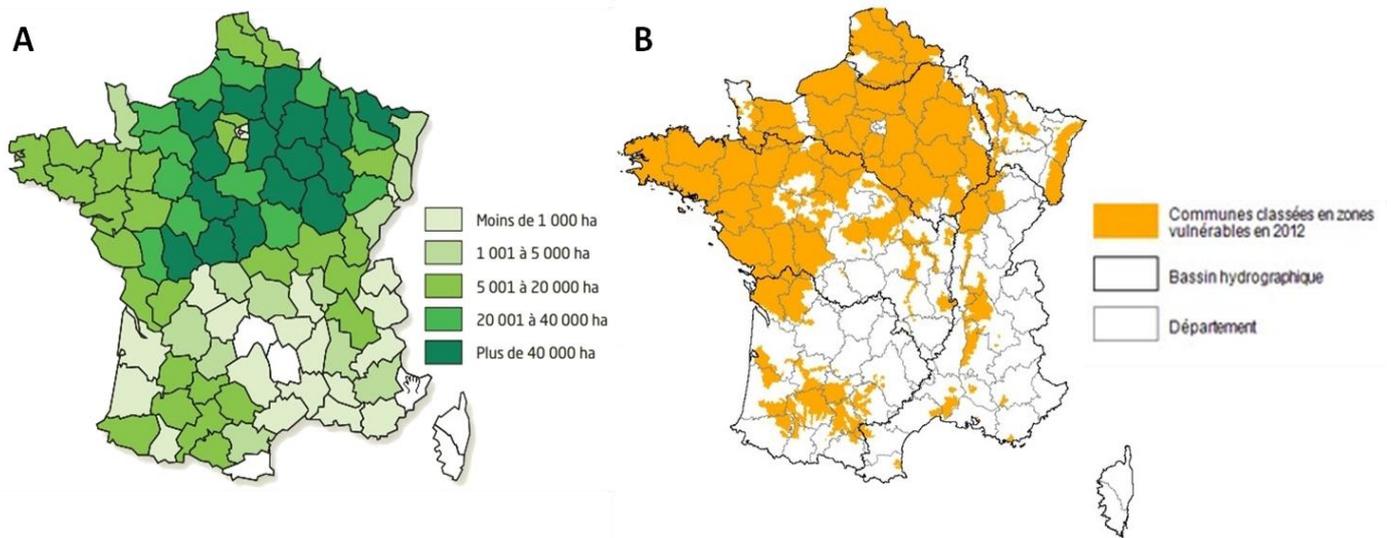


Figure 28 : Carte de répartition des surfaces cultivées de colza par département en 2011 (A, PROLEA-ONIDOL) ; Carte de répartition des zones classées vulnérables en 2012 au sens de la directive "nitrate" 5^{ème} délimitation (B, <http://www.developpement-durable.gouv.fr>)

récolter lorsque le grain présente un taux d'humidité compris entre 8 et 15 % (Sausse *et al.*, 2006).

- **Fertilisation et utilisation de l'azote**

En comparaison à d'autres végétaux d'intérêt agronomique, la culture du colza d'hiver se révèle très exigeante en fertilisants azotés, non pas à cause d'un défaut d'absorption racinaire, mais en raison d'une faible efficacité d'utilisation de l'azote (NUE = Nitrogen Use Efficiency). En effet, environ 50 % seulement de l'azote fourni par le biais de la fertilisation se trouve incorporé dans les graines. Une partie importante de l'azote non-remobilisé est piégée dans les feuilles et les tiges sénescentes et finit donc par être restituée au sol par leur chute (Schjoerring *et al.*, 1995 ; Weisler *et al.*, 2001 ; Rossato *et al.*, 2001 ; Ulas *et al.*, 2013). Les tenants et aboutissants de la remobilisation de l'azote chez le colza seront détaillés par la suite. Quoi qu'il en soit, la fertilisation azotée conditionne donc en grande partie le rendement de la culture. Il est actuellement préconisé de fournir entre 140 et 180 kg d'azote (N) par hectare (ha) et par an, en vue d'obtenir une récolte à rendement élevé (supérieure à 30 q ha⁻¹). La culture du colza nécessite près de 6,5 kg d'azote pour produire un quintal de graines, contre 3 et 2,2 kg pour le blé et le tournesol respectivement (CETIOM ; Rathke *et al.*, 2006).

Outre les pertes d'azote dues à la faible NUE du colza, l'apport conséquent d'intrants azotés entraîne des risques de lixiviation des nitrates vers les nappes phréatiques ou encore d'écoulement de surface vers les cours d'eau, accentuant de ce fait les risques d'eutrophisation et d'acidification des sols. L'élevage et la culture sont à l'origine de 97 % de l'émission d'ammoniac (NH₃) en France (71 % provenant des déjections animales et 26 % des cultures) et de 78 % du protoxyde d'azote (N₂O, gaz à effet de serre), par volatilisation et surtout dégradation par les microorganismes du sol (CITEPA ; Akiyama *et al.*, 2006). Auxquels s'ajoute également la production de nitrates dans le sol par minéralisation des pailles (feuilles, tiges et parois des siliques) après la récolte, si ces derniers ne sont pas absorbés par la mise en place précoce d'une autre culture (Kirkegaard *et al.*, 1999).

L'extension de la culture du colza et les restitutions importantes d'azote dues à celle-ci conduisent donc à un bilan azoté défavorable pour l'environnement. De ce fait, pour parvenir à une agriculture durable et raisonnée, ainsi qu'un meilleur bilan énergétique et économique, il est préconisé de réduire l'usage d'engrais azotés. Dans cet optique, des directives gouvernementales ont vu le jour ces 20 dernières années afin de réglementer les pratiques, et donc de limiter l'impact environnemental négatif de la fertilisation. La directive européenne "nitrate", élaborée en 1991, a imposé l'interdiction d'apport de fertilisants azotés minéraux et uréiques de synthèse du 1^{er} septembre au 15 janvier en zone vulnérable (**Fig. 28**), et fortement déconseillé leur utilisation sur cette période dans les autres zones. D'autres règles ont permis d'imposer l'utilisation d'un calendrier d'épandage fixé par type de fertilisants ou encore de déterminer des distances minimales excluant l'épandage à proximité des eaux de surface et de zones de captage. Les directives "cadre sur l'eau" et "SDAGE" ont ensuite permis entre autres une meilleure prise en compte des besoins azotés des cultures et des reliquats azotés, dans une optique de protection de la ressource en eau et de restauration de la qualité des eaux. Ces directives ont encore été appuyées au sein des Grenelles I et II.

Pour répondre à ces injonctions, le CETIOM a développé dès 1995, au sein de sa charte environnement, un outil d'optimisation de la fertilisation azotée nommé "la réglette azote colza". Cet outil permet de déterminer, de manière très simple, la dose optimale à apporter par l'exploitant agricole sur chacune de ses parcelles de colza. Pour cela, il lui suffit de peser l'équivalent d'une surface de 1m² de colza coupé au collet et de reporter la valeur du poids frais sur la réglette. La quantité d'azote déjà absorbée est ainsi estimée, et par conséquent, la dose optimale restant à apporter. De nouveaux outils numériques ont depuis vus le jour. Ils intègrent les principes de la "réglette azote" au sein de modèles plus complexes d'aide à la fertilisation azotée, tels que PC Azote en Poitou-Charentes, qui modélise le reliquat en sortie d'hiver, Azo-LIS, Epicles ou encore Farmstar qui permet une meilleure représentation de la variabilité des états de croissance au sein des parcelles grâce au couplage de données satellites.

La fourniture d'azote automnale étant interdite ou déconseillée (impact environnemental, amplification des risques de gel, de verse et de sensibilité à certaines maladies), les jeunes plants de colza satisfont leurs besoins à partir de l'azote issu du sol (reliquat de la culture précédente...). La conduite de la fertilisation azotée préconise un fractionnement et un ajustement de la dose d'azote à fournir en fonction de la demande des cultures afin d'améliorer les rendements tout en diminuant les pertes (CETIOM ; Rathke *et al.*, 2006). L'apport est généralement effectué en deux fois (les doses ne devant pas dépasser 100 kg ha⁻¹), tout d'abord durant la reprise de végétation (mi-janvier, février) avec 30 à 50 % de la dose totale, puis durant la montaison (entre les stades C2 et D2) avec 50 à 70 % de la dose totale. Un troisième apport peut-être réalisé si nécessaire au stade E, juste avant la floraison, et représente 20 % de la dose totale. De nombreuses études sont actuellement effectuées sur la mise en place de rotations innovantes (avec des légumineuses principalement) et de cultures associées (avec des légumineuses gélives par exemple) dans l'optique de diminution des intrants azotés. La restitution potentielle en azote des couverts, plus ou moins rapide selon la légumineuse ou le mélange de légumineuses associés et le type de sol, permet une diminution significative de la fertilisation azotée minérale de printemps, entre 30 et 40 U ha⁻¹, sans pénaliser la croissance du colza, ni ses composantes de rendement (nombre de siliques) (Agricultures et Territoires, CA Poitou-Charentes, Trotin and Ginestière, 2012 ; Sauzet *et al.*, 2013).

Pendant des décennies, les variétés de colza ont été sélectionnées pour leur rendement, en présence d'importantes quantités d'intrants azotés. Les nouveaux objectifs économiques et agro-environnementaux imposent de réviser la sélection de caractères génétiques disponibles sur de nouvelles bases et de concevoir des outils de phénotypage adaptés à l'évaluation de caractères génétiques complexes et à l'appréciation de l'efficacité d'utilisation de l'azote et de ses composantes dans un contexte d'apports limités en azote. La finalité est d'obtenir des variétés capables, d'une part, d'absorber plus efficacement l'azote disponible dans le sol (reliquats et fertilisation), mais surtout plus aptes à valoriser et remobiliser l'azote contenu dans les parties végétatives pour leur développement et la production de graines, et ce, même en condition de carence azotée temporaire.

L'étude bibliographique va maintenant s'axer sur les différentes étapes du métabolisme azoté des plantes, en faisant le point sur les connaissances acquises récemment chez le colza et la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, proche phylogénétiquement, majoritairement, mais également chez quelques plantes d'intérêt agronomique. Les mécanismes d'absorption racinaire

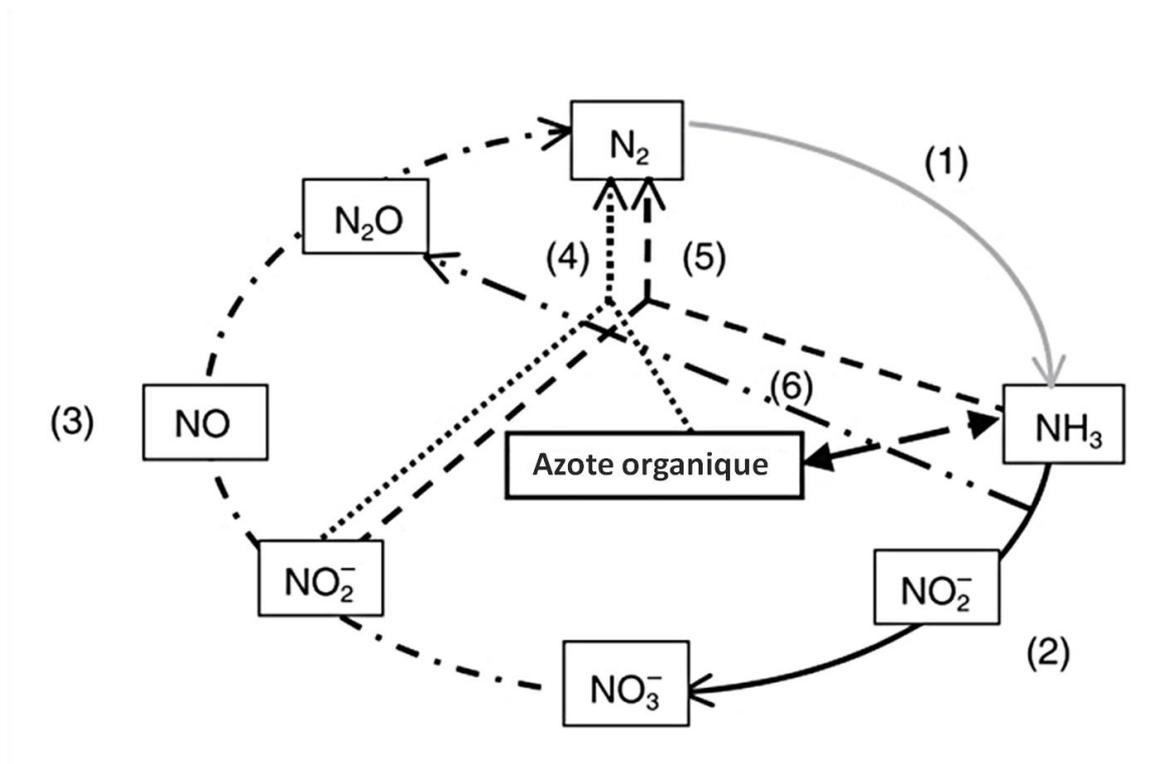


Figure 29 : Cycle de l'azote par les microorganismes du sol (Hayatsu *et al.*, 2008)

(1) : fixation de l'azote atmosphérique

(2) : nitrification par des bactéries, archées et organismes hétérotrophes

(3) : dénitrification par des bactéries aérobies et anaérobies, des archées et des champignons

(4) et (5) : co-dénitrification par des champignons

(5) : bactéries anammox (conversion de NH_3 et NO_2^- en N_2 en condition anaérobie)

(6) : production de N_2O par oxydation de l'ammonium durant la nitrification

de l'azote du sol, de son assimilation, de son transport et de sa réutilisation lors du vieillissement des organes végétatifs y seront détaillés.

2.2. Métabolisme azoté chez les plantes

- **Disponibilité dans le sol**

Hormis les plantes vivant en symbiose avec des organismes fixateurs d'azote atmosphérique et les plantes vivant dans des biotopes riches en azote organique (Näsholm *et al.*, 2009), les nitrates (NO_3^-) et l'ammonium (NH_4^+) constituent les deux principales formes d'azote disponibles dans les sols arables aérés. Durant des décennies, le cycle de l'azote fut expliqué par l'activité de trois groupes bactériens chimiolithoautotrophiques, les bactéries nitrifiantes oxydant le NH_4^+ (AOB pour ammonia-oxidizing bacteria) provenant de la décomposition par les microorganismes des résidus organiques animaux et végétaux et celles oxydant les nitrites (NO_2^- , NOB pour nitrite-oxidizing bacteria) provenant de la première étape de nitrification et produisant du NO_3^- (**Fig. 29, flèche n° 2**), que contrebalance l'activité de bactéries anaérobiques dénitrifiantes (**Fig. 29, flèche n° 3**). Les processus de nitrification s'avèrent être dépendants des conditions pédo-climatiques (température, pH, oxygénation) (Tourna *et al.*, 2008; Nicol *et al.*, 2008; Pereira e Silva, 2012). Des études récentes ont montré que, même si les AOB et NOB semblent jouer un rôle important, un grand nombre d'autres microorganismes (*Archaea*, *Bacteria* et *Eukarya*) interviennent également dans le cycle de l'azote (**Fig. 29**), se révélant donc plus complexe (Hayatsu *et al.*, 2008 ; Di *et al.*, 2009).

D'un point de vue agricole, le nitrate d'ammonium (NH_4NO_3) est principalement utilisé comme fertilisant azoté. Bien que le NH_4^+ soit préférentiellement absorbé par un certain nombre de plantes cultivées (riz, tomate...), en partie grâce au faible coût énergétique que son assimilation représente comparé aux NO_3^- et en fonction de la capacité respiratoire racinaire (Gazzarrini *et al.*, 1999 ; Glass *et al.*, 2002 ; Xu *et al.*, 2012), les microorganismes nitrificateurs restent les premiers utilisateurs de NH_4^+ et produisent donc rapidement une grande quantité des NO_3^- (Inselbacher *et al.*, 2010). La concentration en NO_3^- dans le sol varie de quelques micromolaires (μM) à plusieurs dizaines de millimolaires (mM), et est 10 à 1000 fois supérieure à celle du NH_4^+ . Les nitrates constituent donc la principale source d'azote minéral disponible pour les plantes dans le sol (Morot-Gaudry *et al.*, 2006 ; Dechorgnat *et al.*, 2010). Les engrais ammoniac-nitriques peuvent également être enrichis en SO_3 ou MgO du fait de l'effet synergique du soufre et du magnésium sur l'absorption et l'assimilation de l'azote chez certaines plantes (Decroux *et al.*, 2005).

Les complexes argilo-humiques du sol, chargés négativement, peuvent séquestrer de façon réversible le NH_4^+ , mais pas les NO_3^- du fait de leur charge négative. Cela explique en partie le plus grand risque de lixiviation des nitrates par les eaux de ruissellement. L'utilisation d'urée ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) fut présentée comme une alternative aux engrais nitriques. Cependant, même en présence de nickel, l'uréase végétale étant un métalloenzyme à nickel (Polacco *et al.*, 2013), les rendements obtenus lors d'applications au sol sont plus faibles (Tan *et al.*, 2000 ; Mériçout *et al.*, 2008). L'urée étant moins biodisponible que les nitrates, son assimilation nécessite une

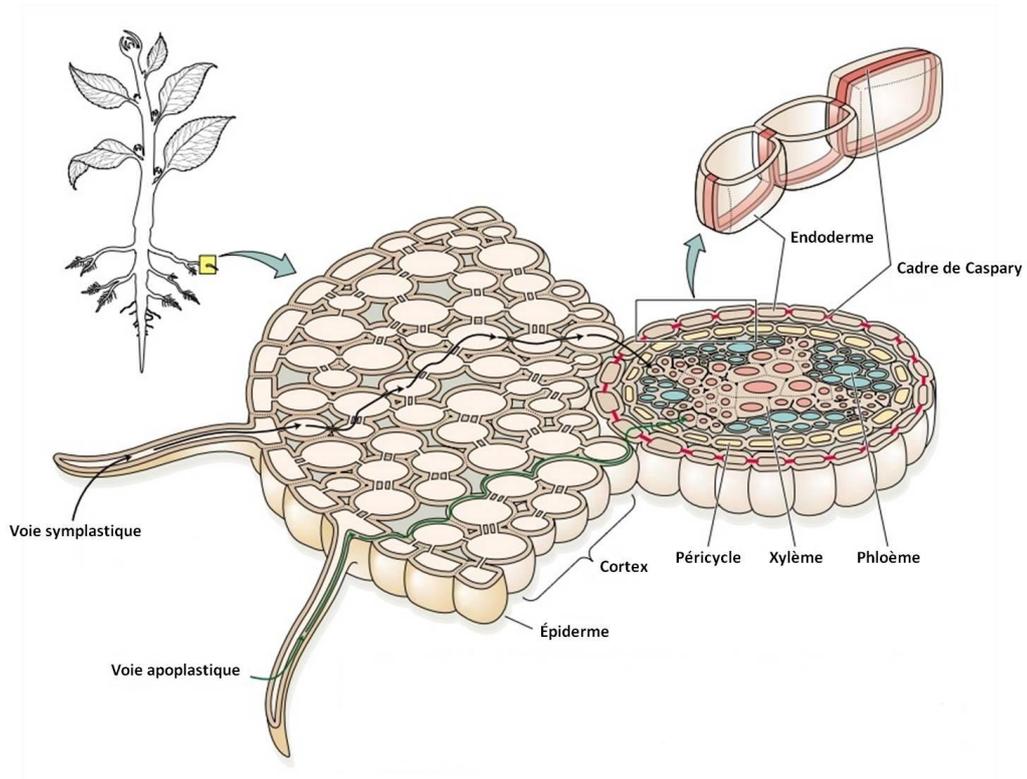


Figure 30 : Voies d'absorption des ions au sein d'une racine (Taiz and Zeiger, 2010)

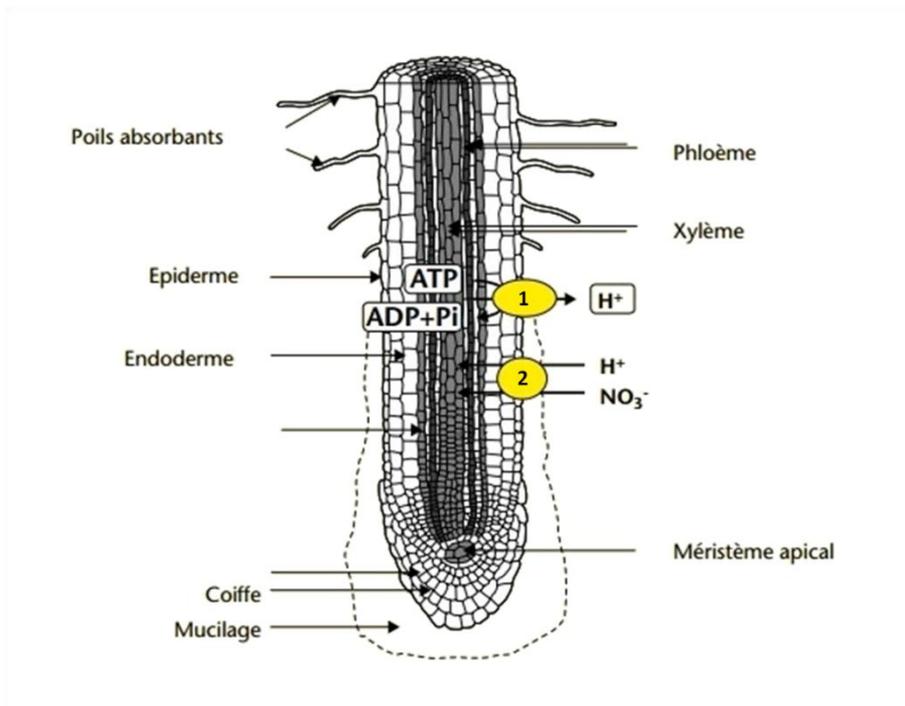


Figure 31 : Système d'absorption racinaire du nitrate (Morot-Gaudry *et al.*, 2006)

1 : ATPase pompe à protons

2 : symport H^+ / NO_3^-

oxydation sous forme de NH_4^+ puis de NO_3^- par les microorganismes du sol. Certaines formulations d'engrais jouent d'ailleurs sur ce principe en additionnant différentes formes d'azote (nitrate, ammonium et urée) en vue d'allonger la période de production de NO_3^- dans le sol et de diminuer la dose apportée initialement, l'urée nécessitant de 1 à 6 semaines suivant la température pour être transformée en NO_3^- dans le sol (<http://www.azote.info>). Du fait de son innocuité relative sur le feuillage, des solutions uréiques sont également utilisées en pulvérisation foliaire et pour l'irrigation fertilisante (Tan *et al.*, 1999 ; Decroux *et al.*, 2005).

2.2.1 Mécanismes de perception et d'absorption

Afin de répondre rapidement aux variations des conditions environnementales et d'assurer leurs besoins en azote, les plantes ont développé des mécanismes d'absorption complexes et finement régulés. En réponse aux contraintes du milieu extérieur, les mécanismes de régulation procurent une plasticité phénotypique nécessaire à l'adaptation rapide des plantes. L'architecture et le niveau de ramification du système racinaire, ainsi que la différenciation de nombreux poils absorbants, sont des facteurs clefs de la capacité de prélèvement dans le sol. L'absorption de l'azote n'est pas réalisée de façon uniforme au sein du système racinaire et diffère en fonction de l'ontogénie et de l'âge de la racine (Tischner, 2000). L'absorption des nitrates serait principalement localisée au niveau des racines matures, où le système vasculaire est déjà développé, alors que celle de l'ammonium aurait lieu au niveau de l'apex (Lazof *et al.*, 1992 ; Colmer and Bloom, 1998). Le transport des ions à travers la racine peut s'effectuer de façon apoplastique ou symplastique, et nécessite l'implication de systèmes de pompes et de transporteurs spécifiques (**Fig. 30**).

Les nitrates, pour être absorbés, doivent être transportés contre des gradients de potentiel électrochimique et de concentration. En effet, par rapport à la rhizosphère, le cytosol des cellules racinaires est chargé négativement (-100 à -250 mV) et est plus concentré en NO_3^- . Le transport des NO_3^- (**Fig. 31**) nécessite donc un apport d'énergie, fournie par une hydrolyse d'adénosine triphosphate (ATP) par des pompes H^+ -ATPases plasmémiques. Il est admis que l'absorption des nitrates est due à un symport H^+/NO_3^- de stœchiométrie 2/1 (Meharg and Blatt, 1995 ; Crawford and Glass, 1998 ; Touraine *et al.*, 2001).

Les plantes ont développé deux systèmes d'absorption des nitrates adaptés aux différentes concentrations de la rhizosphère (**Fig. 32**). Pour les faibles concentrations en nitrates, l'influx est essentiellement assuré par un système de transport à haute affinité (HATS pour *High Affinity Transport System*) saturable dès 200 à 500 μM . La particularité de ce système de transport est de présenter deux composantes, l'une constitutive (cHATS) à forte affinité mais faible capacité de transport et l'autre inductible (iHATS) par les NO_3^- , à plus faible affinité mais à forte capacité de transport. Pour les plus fortes concentrations en NO_3^- (dès 200 à 500 μM), un système de transport à faible affinité (LATS pour *Low Affinity Transport System*) prend le relais et devient majoritaire à partir de 1 mM car non-soumis à saturation avant 50 mM (Glass *et al.*, 2002 ; Morot-Gaudry *et al.*, 2006). Ce second système de transport présente également des composantes constitutive et inductible (cLATS et iLATS respectivement) chez *A. thaliana* (Okamoto *et al.*, 2003) et le colza (Faure-Rabasse *et al.*, 2002). Globalement, les HATS et les LATS

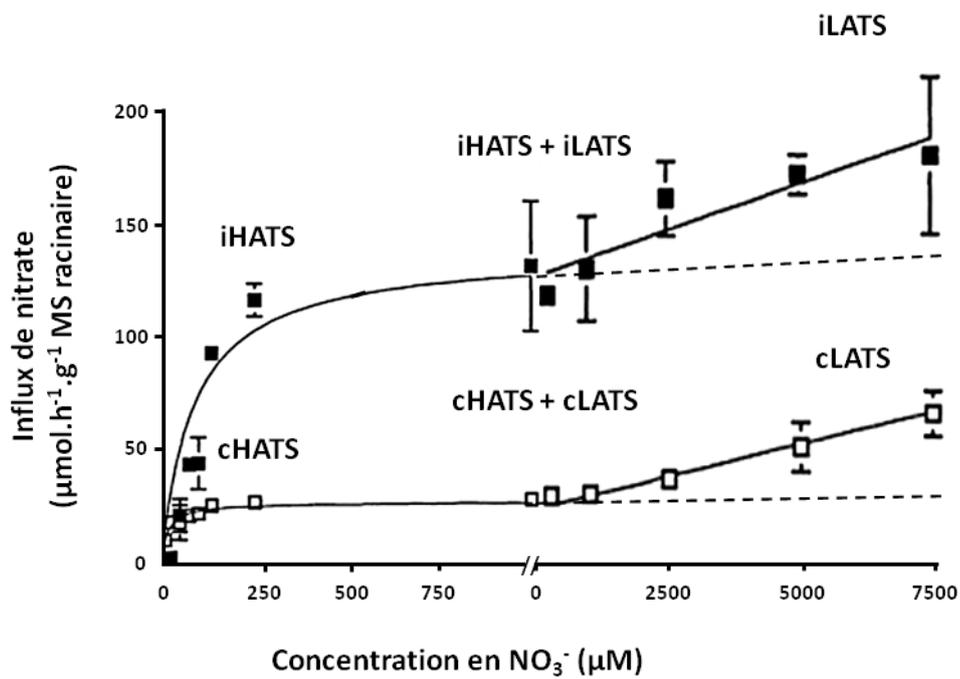


Figure 32 : Cinétiques d'absorption du nitrate par les composantes constitutives (c) et inducibles (i) des systèmes de transport HATS et LATS chez *Brassica napus* (d'après Faure-Rabasse *et al.*, 2002)

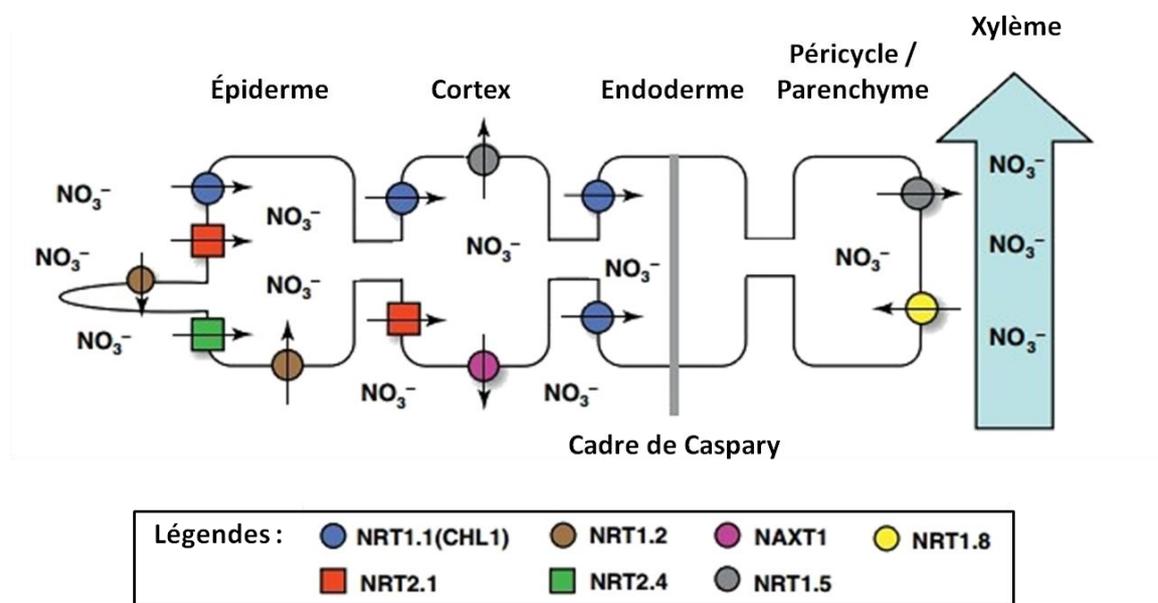


Figure 33 : Implication des différents transporteurs de nitrate dans l'absorption et la translocation racinaire (Wang *et al.*, 2012)

impliqués lors de faibles concentrations en NO_3^- sont caractérisés par la dépense d'énergie inhérente au transport actif de molécules, et sont donc plus facilement sujet à régulation. A l'inverse, lors de fortes concentrations en solutés, les LATS impliqués se comportent plus comme des canaux ioniques et sont donc moins soumis à régulation. Les différents systèmes coexistants et différentiellement régulés permettent à la plante d'adapter rapidement sa capacité d'absorption à la concentration en NO_3^- de la rhizosphère, très hétérogène dans l'espace et dans le temps.

À l'échelle moléculaire, les transporteurs de nitrates des plantes sont codés par deux familles multigéniques distinctes : les gènes *NRT1* et *NRT2* codant respectivement les transporteurs à faible et forte affinité (NRT pour *NitRate Transporter*). Le séquençage du génome d'*A. thaliana* a permis d'identifier 53 gènes *NRT1* et 7 gènes *NRT2* codant des protéines présentant différentes propriétés au sein du schéma d'utilisation de l'azote, allant de l'absorption et la translocation racinaire (AtNRT2.2 AtNRT2.4...; **Fig. 33**) à la décharge foliaire (AtNRT2.7...), en passant par l'organogenèse (Guo *et al.*, 2001 ; Guo, 2002 ; Okamoto *et al.*, 2003) et la réponse aux stress biotiques et abiotiques (NRT2.6 ; Dechorgnat *et al.*, 2012). Le transporteur AtNRT1.1 (également nommé CHL1) fait office d'exception chez *A. thaliana* puisqu'il présente une double affinité et peut donc être classé parmi les HATs et les LATs (Orsel *et al.*, 2004 ; Miller *et al.*, 2007a ; Tsay *et al.*, 2007). Une interaction protéine-protéine a de plus été mise en lumière pour les transporteurs de la famille NRT2 chez *A. thaliana* (excepté AtNRT2.7) dont la liaison à la protéine AtNAR2.1 (également nommée AtNRT3.1) semble essentielle pour l'activité HATs (Orsel *et al.*, 2006 ; Okamoto *et al.*, 2006 ; Laugier *et al.*, 2011 ; Wang *et al.*, 2012 ; Kotur *et al.*, 2012).

Le transporteur de nitrates à double-affinité NRT1.1 (CHL1) fait également office de récepteur (on parle alors de transcepteur) (Ho *et al.*, 2009). En effet, il est impliqué dans la perception et la retransmission du "signal nitrates" au sein de plusieurs mécanismes de réponse au NO_3^- (détaillés au sein de la partie suivante). Ce rôle de récepteur est indépendant de celui de transporteur (Ho *et al.*, 2009). De façon intéressante, ce transporteur à double-affinité présente également une capacité à moduler sa perception et retransmission du "signal nitrates" en fonction de la concentration présente. Ainsi, en présence d'une faible concentration en NO_3^- , ce transcepteur véhicule un "signal nitrates" adapté et induit ainsi des mécanismes de réponse spécifiques, alors qu'en présence de fortes concentrations en NO_3^- , une étape de déphosphorylation de ce transcepteur permet un "switch" de l'affinité et de la capacité de transport du NO_3^- , mais également du type de signal retransmis, et permet l'induction différentielle des gènes de réponse primaire à l'azote. Le transporteur de nitrates NRT2.1 pourrait lui aussi posséder une fonction sensorielle dans le cas de faibles teneurs en azote (Cerezo *et al.*, 2001 ; Miller *et al.*, 2007a ; Ho and Tsay, 2010 ; Gojon *et al.*, 2011 ; Tsay *et al.*, 2011), et pourrait même être le transcepteur le plus important dans la signalétique azote chez le colza (Leblanc *et al.*, 2013).

Du point de vue des flux azotés globaux, l'absorption des nitrates résulte de l'addition de l'influx net présenté jusqu'ici et de l'efflux passif dont le rôle physiologique reste jusqu'à maintenant assez obscur (Dechorgnat *et al.*, 2010). Outre l'impact d'une telle excrétion sur le pH de la rhizosphère (Wang *et al.*, 2012), il semblerait que ce processus puisse jouer un rôle dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Macduff and Jackson, 1992 ; Aslam *et al.*, 1995 ;

Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Il a été démontré, par une approche de biochimie fonctionnelle, qu'une sous-famille des protéines NRT1, nommée NAXT1 (pour NitrAte Excretion Transporter 1) était impliquée dans cet efflux (Segonzac *et al.*, 2007), ainsi que le transporteur AtNRT1.5, en réponse à un gradient de protons lié au pH extérieur (Lin *et al.*, 2008). Bien qu'il est été démontré, l'efflux de NO_3^- est considéré comme négligeable dans les conditions de culture en champ, d'une part car l'azote minéral est souvent perçu comme le principal élément limitant le développement des plantes, et d'autre part du fait de la difficulté méthodologique de quantification au champ d'un potentiel efflux. L'hypothèse d'une réabsorption rapide post-exsorption des NO_3^- est également envisageable.

En parallèle des nitrates, les plantes utilisent l'ammonium disponible dans le sol, plus ou moins préférentiellement suivant les espèces ou le niveau d'oxygénation du sol (Miller and Cramer, 2005). Le terme d'ammonium englobe dans ce cas le couple $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, bien qu'à pH neutre seulement environ 1 % soit sous la forme NH_3 . Les membranes présentent une plus grande perméabilité pour la forme NH_3 de part sa neutralité et peuvent donc impliquer une déprotonation transitoire du NH_4^+ (Ludewig *et al.*, 2007). On distingue également des transporteurs de types HATS et LATS constitutifs, fonctionnant en uniport pour le NH_4^+ et en symport pour NH_3/H^+ (Ludewig, 2006). Ces transporteurs sont codés par des gènes de la famille des *AMTs* (pour AMmonium Transporter), dont quatre des six isoformes sont impliquées dans l'absorption racinaire de l'ammonium chez *A. thaliana* (AMT1.1, AMT1.2, AMT1.3 et AMT1.5) (Yuan *et al.*, 2007). Certains transporteurs (AMT1.1 principalement, AMT1.3 potentiellement) pourraient ici aussi jouer le rôle de transcepteurs du fait de leur implication dans des mécanismes de régulation (détaillés ci-après ; Ho and Tsay, 2010). Certains canaux non-sélectifs des cations (NSCCs pour *Nonselective Cation Channels*) ou sélectifs du potassium chez *A. thaliana* (AKT1 pour *Arabidopsis K⁺ channel*) pourraient être impliqués dans l'influx d'ammonium lors de fortes concentrations externes (Kronzucker *et al.*, 2001; Szczerba *et al.*, 2008). Le rôle de certaines aquaporines dans l'absorption du NH_3 est également soupçonné (Becker, 2011 ; Coskun *et al.*, 2011).

Bien que les principaux consommateurs de l'urée présent dans les fertilisants azotés utilisés en agriculture soit les microorganismes du sol, certaines plantes telles que les *Fabaceae* présentent également un outillage d'absorption et d'utilisation de ce composé, même si son efficacité d'absorption reste plus limitée que celle des nitrates et de l'ammonium (Mérigout *et al.*, 2008). Le transporteur DUR3 de type HATS, fonctionnant en symport $\text{CO}(\text{NH}_2)_2/\text{H}^+$, assure l'absorption de l'urée présente dans la rhizosphère, mais serait également impliqué dans son transport au sein de la plante (Liu, 2003). Des aquaporines pourraient également être à l'origine d'un transport passif de l'urée au travers des différentes membranes cellulaires (Gaspar, 2003 ; Mérigout *et al.*, 2008 ; Maurel *et al.*, 2008 ; Witte, 2011).

L'utilisation omniprésente de fertilisants azotés inorganiques en agriculture conventionnelle tend à faire oublier que les plantes ont également la capacité d'absorber un vaste panel de formes d'azote organique. La concentration de ces composés dans le sol dépend du type d'écosystème en présence (Jones *et al.*, 2002, 2005 ; Hou *et al.*, 2009), mais s'avère généralement inférieure à celle des composés azotés inorganiques des terres cultivées (Näsholm *et al.*, 2009 ; Tegeder and Rentsch, 2010). Ces composés proviennent d'une part de la matière organique du sol (restes de végétaux, fèces animales...) et de sa dégradation par l'activité

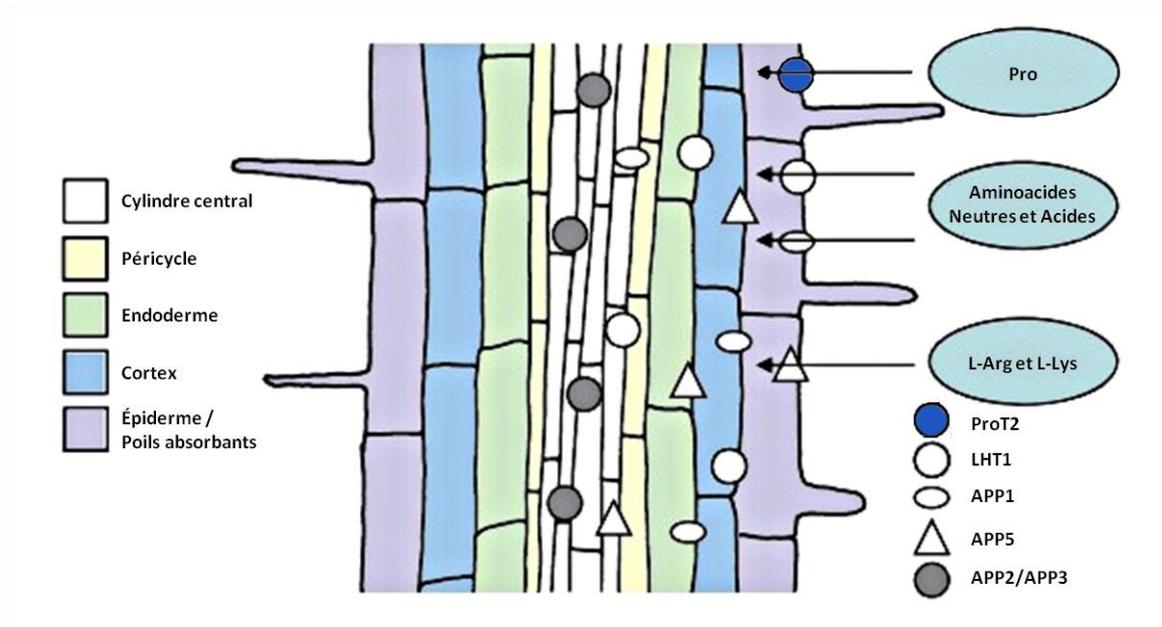


Figure 34 : Modèle d'absorption et de translocation des aminoacides dans une racine non-mycorhizée de plante (d'après Näsholm *et al.*, 2009)

protéolytique d'enzymes (protéases) excrétés par les microorganismes du sol et les systèmes racinaires de plantes (Kohli *et al.*, 2012), et d'autre part de ces organismes eux-mêmes par exsudation de peptides, d'acides aminés ou de protéines (Bais *et al.*, 2006 ; Badri and Vivanco, 2009 ; Näsholm *et al.*, 2009 ; Tegeder and Rentsch, 2010 ; Tegeder, 2012). Cinq transporteurs, faisant partie des AAPs (pour *AminoAcid Permeases*), des LHTs (pour *Lysine Histidine Transporters*) et des ProTs (pour *Proline Transporters*), seraient à l'œuvre dans l'absorption racinaire des acides aminés, en fonction de leur charge (basique, neutre ou acide). Plus précisément (**Fig. 34**), LHT1 joue un rôle dans l'absorption des acides aminés neutres et acides (Hirner, 2006), AAP1 participe à celle des acides aminés neutres (Lee *et al.*, 2007), AAP5 à celle des acides aminés basiques (Svennerstam *et al.*, 2008) et ProT2 à celle de la proline et des bêtaïnes comme la glycine-bêtaïne (Lehmann *et al.*, 2010). L'efficacité d'absorption des acides aminés s'avère, chez certaines plantes, supérieure à celle du NO_3^- ou du NH_4^+ (Näsholm *et al.*, 2009). L'utilisation de l'azote organique n'est pas restreinte aux acides aminés puisqu'un transporteur de di- et tri-peptides (PTR1 pour *Peptide Transporter*) est également à l'œuvre au sein du système racinaire d'*A. thaliana* (Tsay *et al.*, 2007 ; Komarova *et al.*, 2008). De façon plus étonnante, les plantes sont également capables d'absorber directement certaines protéines, et non pas uniquement des produits issus de leur dégradation. Le mécanisme d'endocytose sous-jacent reste à l'heure actuelle inconnu (Paungfoo-Lonhienne *et al.*, 2008). Quoi qu'il en soit, une forte compétition a lieu dans les sols entre les différents microorganismes et les plantes, pour l'obtention de ces composés azotés organiques. La part de l'acquisition de l'azote par le biais de cette voie chez les plantes reste méconnue, mais pourrait être, selon certains auteurs, relativement faible et principalement dédiée à la recapture d'acides aminés et de peptides précédemment exsudés (Jones *et al.*, 2005).

- **Régulation de l'absorption des composés azotés et adaptation à leur disponibilité**

L'absorption des différents composés azotés est un processus soumis à de fortes régulations, à la fois par la disponibilité du milieu en substrat azoté, mais également par des signaux endogènes reflétant le statut nutritionnel et ontologique de la plante. L'objectif de cette partie n'est pas d'énumérer de façon exhaustive l'ensemble des facteurs endogènes et environnementaux pouvant potentiellement exercer une action sur l'absorption de l'azote, ni de détailler les voies de transduction impliquées dans la réponse au "signal azote", mais de donner une vue d'ensemble des différents schémas de régulation.

Les mécanismes fins de régulation permettent d'adapter la physiologie et la morphologie de la plante à la disponibilité, dans l'espace et dans le temps, des composés azotés dans la rhizosphère. Ainsi, quatre grands processus d'adaptation aux contraintes environnementales sont mis en place en réponse à la présence ou l'absence de composés azotés. Tout d'abord, une forte régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de l'activité des transporteurs permet d'ajuster l'efficacité d'absorption de ces composés à leur concentration dans la rhizosphère (Munos, 2004; Gojon *et al.*, 2009). Ensuite, une régulation de l'accumulation et de la remobilisation des NO_3^- au sein de la vacuole (Martinoia *et al.*, 1981 ; De Angeli *et al.*, 2006), et plus particulièrement dans certains organes comme le pétiole (Chiu *et al.*, 2004 ; Tsay *et al.*, 2007), permet de palier à de possibles carences temporaires. Une régulation du développement

et du métabolisme de la partie aérienne est également réalisée en fonction de la disponibilité en azote (Chen *et al.*, 2004 ; Hermans *et al.*, 2006 ; Tsay *et al.*, 2011 ; Puig *et al.*, 2012). Enfin, la modulation de l'architecture racinaire à la disponibilité des composés azotés est un des facteurs clefs de l'adaptabilité de la plante à son environnement.

Ainsi, la disponibilité en NO_3^- impacte le développement de la racine principale bien qu'on ait longtemps dit le contraire (Walch-Liu and Forde, 2008), mais structure surtout le nombre et la longueur des racines latérales. En effet, la faible concentration en NO_3^- tend à accélérer le développement du système racinaire et à accroître le nombre de racines latérales afin d'augmenter la surface de sol explorée (Tranbarger *et al.*, 2003 ; Hodge, 2004 ; Remans *et al.*, 2006b). Mais à l'inverse, la présence localisée de NO_3^- au sein de la rhizosphère de plantes préalablement carencées en azote tend à stimuler la croissance des racines latérales déjà établies afin d'augmenter la colonisation de périmètres riches en azote. Somme toute, une forte concentration en NO_3^- tend à inhiber de façon systémique l'activation du méristème de racines latérales nouvellement initiées limitant ainsi leur nombre (Zhang and Forde, 2000 ; López-Bucio *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2007 ; Gojon *et al.*, 2009). L'ammonium est quant à lui responsable, directement et indirectement, d'une inhibition du développement racinaire et de l'absorption des NO_3^- (Kronzucker *et al.*, 1999 ; Crawford and Forde, 2002 ; Lanquar *et al.*, 2009 ; Tsay *et al.*, 2011). Il est possible d'entrevoir une corrélation entre la plasticité phénotypique et la biodisponibilité/mobilité de ces composés comme la nécessité d'une réponse rapide de la plante aux variations de son environnement. L'adéquation des signaux de carence et de présence de l'azote dans différentes parties du système racinaire de la plante participe à l'optimisation de structures d'absorption (architecture racinaire, efficacité d'absorption...) en vue de pallier aux besoins de toute la plante, tout en restant économe d'un point de vue énergétique (Ruffel *et al.*, 2011).

- **Les nitrates et l'ammonium jouent le rôle de molécules "signal"**

L'absorption des composés azotés est tout d'abord régulée par ces composés eux-mêmes, grâce à l'implication des premiers acteurs de la régulation que sont les récepteurs, et plus précisément les transcepteurs dans le cas du NO_3^- et du NH_4^+ . Le "signal nitrates" est caractérisé par une "réponse primaire nitrates" extrêmement rapide au niveau transcriptionnel (quelques minutes), induisant la surexpression d'un certain nombre de gènes impliqués aussi bien dans le transport de cet ion et son assimilation, que dans l'architecture racinaire, l'expansion des feuilles, la dormance des graines ou la floraison (Tranbarger *et al.*, 2003 ; Scheible, 2004 ; Wang, 2004 ; Alboresi *et al.*, 2005 ; Hu *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2009 ; Krouk *et al.*, 2010a ; Castro Marín *et al.*, 2010). La transduction du "signal azote" semble être lié à l'induction extrêmement rapide de la phosphorylation d'un certain nombre de protéines (Engelsberger and Schulze, 2012). Le transcepteur NRT1.1 (CHL1) est connu pour être impliqué dans des mécanismes de réponse au NO_3^- , comme la surexpression du transporteur NRT2.1 (Munos, 2004), ou l'élongation des racines latérales (Remans *et al.*, 2006a) par le biais d'une accumulation d'auxine médiée par le transporteur lui-même (il serait responsable de l'efflux d'auxine en absence de NO_3^-) (Krouk *et al.*, 2010b ; Gojon *et al.*, 2011 ; Lavenus *et al.*, 2013). NRT1.1 est également impliqué dans des mécanismes induits par l'absence de NO_3^- comme la

répression du développement de la partie aérienne, la tolérance à l'excès de NH_4^+ ou encore la surexpression de gènes des voies de biosynthèse des GLS (Hachiya *et al.*, 2010). Le transcepteur NRT2.1 est quant à lui impliqué dans la régulation de l'architecture racinaire et plus précisément de l'initiation des racines latérales, en connectant les voies de signalisation des sucres à celle des NO_3^- (Cerezo *et al.*, 2001 ; Little *et al.*, 2005 ; Remans *et al.*, 2006b ; Hermans *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2007 ; Miller *et al.*, 2007a ; Girin *et al.*, 2007 ; Ho and Tsay, 2010 ; Gojon *et al.*, 2011 ; Tsay *et al.*, 2011 ; Le Ny *et al.*, 2013). La régulation de son activité de transporteur, fortement liée à celle de la protéine NAR2.1, semble être essentiellement post-transcriptionnelle (Laugier *et al.*, 2011). De façon intéressante, deux études sont parvenues à démontrer que le signal azote impliqué dans la régulation positive de l'absorption du NO_3^- , via les transporteurs BnNRT1.1 et BnNRT2.1 chez le colza, est également moteur du flux d'eau vers les organes en croissance, et ce en amont de la diminution du potentiel osmotique induite par l'accumulation de NO_3^- et d'osmolytes compagnons comme le potassium (K^+) dans les feuilles (Le Ny *et al.*, 2013 ; Leblanc *et al.*, 2013). Le signal azote est donc nécessaire au maintien de la turgescence et de la croissance des parties aériennes via la signalétique hormonale induite.

Dans le cas de l'ammonium, le transporteur AMT1.1 présente toutes les caractéristiques d'un transcepteur puisqu'une régulation transcriptionnelle négative du gène codant pour ce transporteur est observée en présence d'une forte quantité d'azote, ainsi qu'une dérépression lors d'une carence en azote (Gansel *et al.*, 2001 ; Loqué *et al.*, 2006), mais aussi car l'hétérogénéité de l'ammonium dans l'espace et dans le temps au sein de la rhizosphère impacte directement son état de phosphorylation et donc sa capacité de transport (Lanquar *et al.*, 2009). Le transporteur AMT1.3, de part son implication dans la stimulation de l'initiation des racines latérales (lateral root branching) par le NH_4^+ , pourrait lui aussi être pourvu d'une aptitude sensorielle (Lima *et al.*, 2010 ; Tsay *et al.*, 2011). La forte régulation des transporteurs HATS (famille des AMTs), par le biais de modifications allostériques, permettrait d'éviter l'accumulation toxique du NH_4^+ , dans le cas de concentrations externes modérées (Loqué *et al.*, 2007 ; Neuhauser *et al.*, 2007). Lors de fortes concentrations en NH_4^+ , la toxicité induite serait due en grande partie au "cycle futile du plasmalemmes" instauré par les transporteurs LATS moins régulés (NSCCs, AKT1, aquaporines...), du fait du coût énergétique très important du transport bidirectionnel influx/efflux de ratio proche de 1 (Kronzucker *et al.*, 2001 ; Britto and Kronzucker, 2006). Cela n'exclue en rien l'impact négatif de l'accumulation de NH_4^+ sur le pH cytosolique, l'absorption d'autres ions ou le statut carboné de la plante (Gerendás *et al.*, 1997).

Il existe également des formes de régulation cellules-spécifiques faisant intervenir des mécanismes transcriptionnels induits par les composés azotés. C'est le cas par exemple de l'initiation des racines latérales où les NO_3^- jouent le rôle d'inhibiteur de la transcription du microARN miR167, induisant l'augmentation du nombre de transcrits du facteur de transcription (FT) médié par l'auxine *ARF8* au niveau du péricycle et déclenchant ainsi l'initiation de primordia racinaires (Gifford *et al.*, 2008). De façon comparable, le FT *AFB3*, fortement impliqué dans l'architecture racinaire (développement des racines primaire et latérales), est en partie régulé par le miR393 induit par le NO_3^- (Vidal *et al.*, 2010). Les transporteurs NRT1.1 et NRT2.1 semblent également soumis à une régulation induite par le miR169 via le FT *NFYA* (Zhao *et al.*, 2011). Plus globalement, des miRNAs semblent impliqués dans la réponse au "signal azote". Connaissant leur possible translocation par le biais du phloème, ces miRNAs pourraient donc participer à la transduction du signal azote et à la régulation longue-distance opérée par la partie

aérienne sur le système racinaire (Zhao *et al.*, 2012). Enfin, l'implication de modifications post-transcriptionnelles de la chromatine (méthylation des histones) est également suspectée dans la régulation du transporteur NRT2.1 (Widiez *et al.*, 2011).

- **Régulation de l'absorption de composés azotés par les produits de leur assimilation ou de la photosynthèse**

De nombreux travaux ont montré que l'absorption des nitrates et de l'ammonium variait au cours d'un cycle nyctéméral, avec une augmentation significative durant la période diurne (Gazzarrini *et al.*, 1999 ; Tischner, 2000 ; Matt *et al.*, 2001 ; Lejay *et al.*, 2003 ; Malagoli, 2004 ; Lillo, 2008). Cette augmentation de l'influx de NO_3^- et de NH_4^+ est directement liée à la surexpression de gènes codant pour les transporteurs NRT1.1 et NRT2.1 d'une part, et AMT1.1, AMT1.2 et AMT1.3 d'autre part, lors de l'exposition à la lumière (Gazzarrini *et al.*, 1999 ; Lejay *et al.*, 1999 ; Matt *et al.*, 2001). L'inhibition de l'absorption de NO_3^- durant la phase nocturne pouvant être levée par l'apport exogène de sucres, plusieurs oses issus de la photosynthèse ou de la glycolyse sont donc suspectés de jouer un rôle dans la signalisation du statut carboné de la plante et dans la régulation positive de l'acquisition de l'azote et d'autres ions (Stitt and Feil, 1999 ; Matt *et al.*, 2001 ; Lejay *et al.*, 2003). À ce titre, une étude récente a mis en lumière le rôle majeur d'un hexose phosphorylé accumulé durant la phase diurne, le glucose-6-phosphate (G6P), dans la surexpression de ces transporteurs (Lejay *et al.*, 2008). Ici aussi une régulation post-transcriptionnelle du transporteur NRT2.1 semble avoir lieu en réponse au signal sucre (Wirth *et al.*, 2007), ce qui induirait une forme de réceptivité potentielle à certains oses, directe ou indirecte, de ce transcepteur putatif. Cela indiquerait également un possible rôle du cycle oxydatif des pentoses phosphates dans l'émission d'un signal de régulation de l'acquisition de l'azote (Lejay *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009).

Plusieurs modèles ont également proposé d'expliquer en partie la régulation de l'absorption de l'azote par le rétrocontrôle négatif exercé par certains aminoacides comme témoins du statut azoté (Cooper and Clarkson, 1989 ; Imsande and Touraine, 1994), mais également soufré des parties aériennes (Migge *et al.*, 2000 ; Prosser *et al.*, 2001 ; Kaur *et al.*, 2010 ; Lee *et al.*, 2012). Le mode de translocation des molécules actives dans ce rétrocontrôle n'est pas encore bien défini. On suspecte fortement le phloème (Cooper and Clarkson, 1989 ; Pal'ove-Balang and Mistrík, 2002 ; Beuve *et al.*, 2004), mais également l'apoplaste ou un compartiment subcellulaire (Miller *et al.*, 2007b). L'apport exogène et la forte concentration des tissus en aminoacides sont connus pour réguler négativement l'absorption racinaire du NO_3^- et du NH_4^+ (Lee *et al.*, 1992 ; Muller *et al.*, 1995), mais également pour réprimer la transcription de gènes codant pour certains de leurs transporteurs (Vidmar *et al.*, 2000 ; Ho and Tsay, 2010). Plusieurs aminoacides semblent déclencher des réactions comparables (Glu, Gln, Asp, Asn, GABA), puisque leur absorption suffit à maintenir le statut azoté de la plante. Néanmoins, de possibles interconversions peuvent avoir lieu au sein des tissus racinaires. Des approches basées sur l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques d'enzymes impliqués dans l'assimilation de l'azote ont démontré le rôle majoritaire de la Gln dans l'inhibition de l'absorption du NO_3^- (Vidmar *et al.*, 2000 ; Gansel *et al.*, 2001 ; Naoza *et al.*, 2003 ; Miller *et al.*, 2007b), mais également du NH_4^+ par le biais d'une régulation transcriptionnelle négative du gène codant pour le transporteur AMT1.1

(Ho and Tsay, 2010). La régulation négative inhérente à l'accumulation de Gln (et de NH_4^+) serait due à la transduction du signal induit par le transcepteur NRT1.1 aux autres transporteurs (NRT2.1, NRT3.1) et non à l'action directe de la Gln sur tous les transporteurs (Krouk *et al.*, 2006 ; Le Ny *et al.*, 2013). L'effet observé suite à un apport exogène d'acides aminés serait principalement dû à l'augmentation du pool d'acides aminés des cellules racinaires (Fan, 2006 ; Miller *et al.*, 2007b ; Barbosa *et al.*, 2010).

Seules quelques études se sont intéressées à l'impact direct d'acides aminés présents dans la rhizosphère, notamment le Glu, sur l'absorption de l'azote, sachant qu'il existerait des récepteurs du Glu interne et externe bien distincts (Gutiérrez *et al.*, 2008), et que l'implication de Glutamate-Receptor-Like Proteins (GLR) du phloème, fonctionnant comme des transporteurs d'acides aminés et de Ca^{2+} , vient récemment d'être démontrée dans la régulation de la production des primordia de racines latérales (Vincill *et al.*, 2013). Ainsi, le Glu exogène inhiberait la croissance de la racine principale et stimulerait celle des racines latérales de façon antagoniste à celle du NO_3^- , par l'intermédiaire du transcepteur NRT1.1 (Walch-Liu and Forde, 2008 ; Kim *et al.*, 2009). De façon contradictoire, Leblanc et associés soutiennent l'hypothèse de voies de signalisation bien distinctes entre le Glu et le NO_3^- (Leblanc *et al.*, 2013).

Enfin, il a été démontré chez le colza que l'acide γ -aminobutyrique (GABA), véhiculé par le phloème, régule positivement l'absorption du NO_3^- par une surexpression du gène codant pour le transporteur BnNRT2, alors que d'autres acides aminés (Gln, Glu et Asn) le régulent négativement (Beuve *et al.*, 2004). Toutefois, le rôle putatif du GABA est remis en cause du fait de la technique d'exsudation foliaire utilisée (diffusion facilitée par l'EDTA), puisqu'il serait dans ce cas attribué à l'impact de la blessure (Shelp, 2012). Le rôle de l'O-acetyl-serine (OAS) molécule signal à l'interface des métabolismes azotés et sulfurés (Kim *et al.*, 1999 ; Hesse *et al.*, 2004 ; Hubberten *et al.*, 2012) est également débattu en tant que régulateur négatif de l'absorption de l'azote (Kaur *et al.*, 2010). Enfin, l'Asn semble également jouer un rôle au niveau de l'absorption du NO_3^- puisque les dérégulations métaboliques induites par l'inactivation du gène *ASN2* chez *A. thaliana* induisent une diminution de l'influx de NO_3^- , les auteurs posant l'hypothèse d'un impact du déséquilibre GABA/Pro induit par la mutation sur les mécanismes d'absorption et d'assimilation de l'azote (Gaufichon *et al.*, 2013).

Parallèlement, certains auteurs ont développé des modèles mettant en lumière l'importance des acides organiques issus de l'assimilation de l'azote foliaire dans la régulation positive de l'absorption de l'azote et qui expliquent en partie l'inhibition observée durant la phase nocturne (Ben Zioni *et al.*, 1971 ; Touraine *et al.*, 1992). Suite à des études plus récentes, les mécanismes de base de ces modèles ont un peu évolué. La synthèse d'acides organiques est fortement liée à celle des acides aminés, puisque d'une part, le 2-oxoglutarate est un substrat de la GOGAT et un produit d'un certain nombre d'aminotransférases, et d'autre part car la synthèse de certains acides organiques (oxaloacetate, citrate et malate) contrebalancerait la production d'ions hydroxydes (HO^-) concomitante à la synthèse d'acides aminés (Scheible *et al.*, 1997). Le malate synthétisé dans les tissus photosynthétiques serait par la suite véhiculé par le phloème jusqu'aux racines, où il jouerait un rôle dans l'homéostasie du pH au même titre que l'exsorption de protons ou d'ions bicarbonates (HCO_3^-). L'identification d'un transporteur spécifique du malate et du fumarate (AttdT pour *A. thaliana Dicarboxylate Transporter*), ayant un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (Hurth, 2005) et la mise en lumière de sa régulation

par un signal dépendant du NO_3^- via le transcepteur NRT1.1 (Hu *et al.*, 2009) permet d'appuyer le rôle potentiel du métabolisme des acides organiques et de l'homéostasie du pH dans l'absorption et l'assimilation des nitrates (Nunes-Nesi *et al.*, 2010). Plus globalement, la régulation positive effectuée par les sucres, les aminoacides et les acides organiques peut être perçue comme la nécessité d'une fourniture énergétique constante, sous forme d'ATP et de squelettes carbonés, liée à la photosynthèse. L'inhibition observée durant la phase nocturne serait donc due, dans ce cas, à la limitation des substrats carbonés, de l'ATP et du pouvoir réducteur nécessaires à l'assimilation de l'azote, induisant de ce fait une augmentation de la concentration en NO_3^- et NH_4^+ susceptible d'induire une inhibition de leur absorption.

- **Rôle des phytohormones et d'autres acteurs environnementaux**

L'implication de certaines phytohormones a également été démontrée dans la régulation de l'absorption de l'azote et la signalétique azote, en tant que messenger longue distance (Kiba *et al.*, 2010). Les cytokinines (CKs) pourraient jouer le rôle de molécules signales de la satiété en azote de part la régulation négative qu'elles opèrent sur certains transporteurs de nitrates, d'ammonium, d'aminoacides et d'urée (Brenner *et al.*, 2005 ; Sakakibara *et al.*, 2006 ; Kiba *et al.*, 2010 ; Ruffel *et al.*, 2011). Le rôle de phytohormones est fortement présumé dans le processus d'inhibition du développement des racines latérales lors de fortes concentrations en NO_3^- , puisque la biosynthèse ou le transport de l'auxine (AIA) des parties aériennes vers les racines semble être inhibé dans ces conditions (Zhang *et al.*, 1999, 2007 ; Walch-Liu, 2006 ; Tian *et al.*, 2008). L'acide abscissique (ABA) interviendrait également dans ce processus en induisant une forme de "dormance des racines latérales" (Signora *et al.*, 2001 ; De Smet *et al.*, 2006 ; Lavenus *et al.*, 2013). Le rôle de l'AIA dans l'initiation et l'élongation des racines latérales en réponse au NO_3^- a été détaillé précédemment. Enfin, Zheng et associés suspectent l'implication de l'éthylène dans la signalétique azote, d'une part en tant que messenger du signal "carence" au niveau racinaire, mais également dans le rétrocontrôle de l'activité du transporteur NRT2.1 (Zheng *et al.*, 2013). Plus globalement, la signalétique azote semble être fortement impliquée dans la régulation de la synthèse et du transport de plusieurs phytohormones (AIA, ABA et CKs majoritairement) qui agiraient en tant qu'amplificateurs de ce signal et permettraient l'induction d'un grand nombre de processus développementaux au niveau des parties aériennes et du système racinaire (Nero *et al.*, 2009 ; Le Ny *et al.*, 2013 ; Leblanc *et al.*, 2013).

Comme la plupart des *Brassicaceae*, le colza s'avère être une culture fortement dépendante de la nutrition soufrée (Blake-Kalff *et al.*, 2000 ; Grant *et al.*, 2012). De nombreux travaux rapportent la forte interconnexion des nutriments azotés et soufrés, d'un point de vue métabolique, mais également au niveau de l'absorption de ces nutriments (Janzen and Bettany, 1984 ; Fismes *et al.*, 2000 ; Koprivova *et al.*, 2000 ; Kopriva and Rennenberg, 2004 ; Loudet *et al.*, 2007 ; Takahashi *et al.*, 2011). Kaur et collaborateurs ont démontré qu'une carence en soufre régule négativement certains transporteurs de nitrates et ainsi diminue l'absorption du NO_3^- chez le colza (Kaur *et al.*, 2010). A l'inverse, plusieurs travaux ne rapportent aucun impact d'une déficience temporaire en soufre sur l'absorption du NO_3^- au stade rosette (Abdallah *et al.*, 2010, 2011 ; Lee *et al.*, 2012). Ces résultats contradictoires peuvent être imputables aux différentes techniques de mesure de l'absorption employées (dosage du NO_3^- restant dans la solution

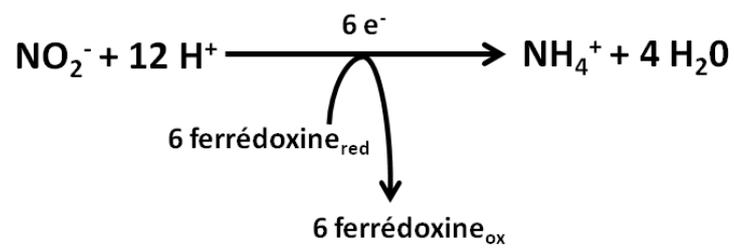


Figure 35 : Réactions enzymatiques catalysées par la nitrate réductase et la nitrite réductase

nutritive *versus* traçage isotopique ^{15}N), mais surtout à la présence ou l'absence de réserves soufrées et azotées, majoritairement au sein du compartiment foliaire, due à la différence d'âge des plantes étudiées qui conditionne considérablement la dynamique d'utilisation de ces nutriments (cf § "Régulation de la sénescence foliaire"). L'absence de réserves soufrées pourrait être perçue, dans ce cas, comme une carence prononcée en soufre induisant une inhibition de la synthèse protéique, une accumulation d'acides aminés et un changement dans la dynamique des relations sources/puits au profit du système racinaire, résultant ainsi, par l'accumulation de molécules signales dans le compartiment racinaire (OAS, Gln) à une rétro-inhibition des transporteurs de NO_3^- (Hesse *et al.*, 2004 ; Abdallah *et al.*, 2010 ; Lee *et al.*, 2012).

2.2.2 Assimilation et transport de l'azote

- **Mécanismes de réduction de l'azote inorganique**

Suite à leur absorption, les nitrates peuvent être stockés transitoirement dans la vacuole via le transporteur CLCa (De Angeli *et al.*, 2006), ou être réduits et assimilés. Ces processus peuvent avoir lieu dans les racines ou dans les feuilles après exportation du NO_3^- par voie xylémienne via des transporteurs NRT impliqués dans la charge et la décharge xylémienne (Li *et al.*, 2010 ; Krouk *et al.*, 2010a ; Dechornat *et al.*, 2010). Chez les plantes herbacées, la réduction et l'assimilation du NO_3^- sont majoritairement effectuées au sein du compartiment foliaire, surtout lors de concentrations importantes en azote inorganique (Andrews, 1986 ; Gojon *et al.*, 1994), même si le ratio feuille/racine est très variable suivant les espèces. Le colza ne déroge pas à cette règle puisqu'environ 90 % du NO_3^- absorbé est assimilé dans le compartiment foliaire (Leleu *et al.*, 2000 ; Rossato *et al.*, 2001 ; Leleu, 2004 ; Gauthier *et al.*, 2012a).

La réduction des nitrates est effectuée en deux étapes bien distinctes, puisque l'ion nitrate est tout d'abord réduit en nitrite (NO_2^-) au sein du cytoplasme par la nitrate réductase (NR), et l'ion nitrite est ensuite véhiculé et réduit en ammonium dans les plastes par la nitrite réductase (NiR, EC 1.7.7.1 ; Crawford and Forde, 2002). La réaction enzymatique catalysée par la NR (**Fig. 35**) nécessite l'apport de pouvoir réducteur sous forme de NADH (NADH-NR, EC 1.7.1.1) pour la plupart des espèces, voire de NAD(P)H pour quelques espèces (NAD(P)H-NR, EC 1.7.1.2 ; maïs, riz, soja, orge, sétaires, bouleau...) ou plus rarement spécifiquement de NADPH (NADPH-NR, EC 1.7.1.3 ; Hageman and Hucklesby, 1971 ; Srivastava and Shankar, 1996). La réaction enzymatique catalysée par la nitrite réductase (**Fig. 35**) nécessite l'apport d'un cofacteur, la ferrédoxine réduite issue de la photosynthèse. À l'échelle moléculaire, la NR est codée par les gènes *NIA1* et *NIA2*, contribuant respectivement à 10 - 15 % et 85 - 90 % de l'activité nitrate réductase (NRA) (Wilkinson and Crawford, 1993 ; Crawford and Forde, 2002), et la NiR est quant à elle codée par le gène *NIR1*, chez *A. thaliana*.

En dehors de la réduction des nitrates en nitrites, la NR peut également catalyser la production de NO et de $\text{NO}_{(x)}$ à partir du NO_2^- (Kaiser and Huber, 2001 ; Rockel *et al.*, 2002). On connaît le rôle du NO comme messenger de la réponse des plantes à certains pathogènes, mais il semblerait que le NO produit par la NR puisse également jouer un rôle important dans la fermeture des stomates induites par l'ABA (Desikan *et al.*, 2002 ; Hancock *et al.*, 2011).

- **Mécanismes de régulation de la nitrate réductase et de la nitrite réductase**

La réduction des nitrates en ammonium est fortement liée à la machinerie photosynthétique par dépendance à l'énergie, au pouvoir réducteur et aux cofacteurs qui en sont issus. Afin d'éviter toute accumulation toxique de NO_2^- qui induirait la dégradation de l'appareil photosynthétique, la production de $\text{NO}_{(x)}$ ou de peroxy-nitrite en présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), et l'oxydation de protéine et afin de répondre aux variations de l'absorption du NO_3^- , des mécanismes de régulation extrêmement fins et rapides de la NR et de la NiR sont mis en place en réponse à un certain nombre de stimuli. Cette fois encore, l'objectif de cette partie n'est pas d'énumérer de façon exhaustive l'ensemble des facteurs endogènes et environnementaux pouvant potentiellement exercer une action sur les mécanismes de réduction du NO_3^- , ni de détailler les voies de transduction impliquées, mais seulement de donner une vue d'ensemble des différents schémas de régulation.

La NR fut longtemps un des enzymes les plus étudiés en raison de son inductibilité par son substrat. De ce fait, une littérature abondante relate les études de sa régulation (Srivastava and Shankar, 1996 ; Campbell, 1999 ; Meyer and Stitt, 2001 ; Kaiser and Huber, 2001 ; Crawford and Forde, 2002 ; Lillo *et al.*, 2004 ; Lea *et al.*, 2006). La présence de NO_3^- induit une surexpression rapide (quelques minutes) des gènes *NIA1*, *NIA2* et *NIR1* probablement via des FT appartenant à la famille des NLPs (NIN-LIKE PROTEINs ; Castaings *et al.*, 2009, 2010 ; Konishi and Yanagisawa, 2013). L'existence d'éléments *cis* de régulation et d'une portion inductible de la région flanquante 3' du gène *NIA1* a été démontrée (Wang *et al.*, 2010 ; Konishi and Yanagisawa, 2011). L'ion NO_3^- induit également la synthèse *de novo* de protéines NR, mais aussi une augmentation rapide de l'activité NR. En dépit de recherches toujours actives sur l'identification d'éléments de réponse aux nitrates (NREs pour *Nitrate Responsive Element*) ou d'éléments impliqués dans la voie de transduction du "signal nitrates" (comme les NLPs), beaucoup d'acteurs supposés de ces voies de signalisation restent encore à caractériser. L'ion NO_2^- quant à lui réprime fortement l'accumulation de transcrits du gène *NIA1* et du gène codant pour le transcepteur NRT1.1 (Loqué, 2003), et induit une forte activité NiR (Cabello *et al.*, 1998).

La régulation particulièrement rapide et efficace de la NR est effectuée majoritairement grâce à un mécanisme d'inactivation post-transcriptionnelle axé autour de la phosphorylation de la protéine suivie de la liaison à une protéine 14-3-3 (Lea *et al.*, 2006). L'étape de phosphorylation n'entraîne pas directement la baisse d'activité de la protéine. Elle est par contre nécessaire à la fixation des protéines 14-3-3 sur la NR, en présence de cations bivalents (comme le Mg^{2+} ou le Ca^{2+}), qui par l'induction d'un changement conformationnel augmentant la distance entre deux sites redox de la protéine, permet l'inhibition de son activité de réduction du NO_3^- (Lambeck *et al.*, 2011). La réactivation de la NR est effectuée par déphosphorylation via la Protéine Phosphatase 2A (PP2A) (MacKintosh, 1992 ; Heidari *et al.*, 2011). Ce mode de régulation (via les protéines 14-3-3) est d'ailleurs commun à un certain nombre de processus clefs comme le métabolisme primaire (Saccharose Phosphate Synthase, H^+ -ATPases, Gln Synthetase, enzymes du cycle des acides tricarboxyliques (TCAP pour *TriCarboxylic Acid Pathway*), O-acetylserine(thiol)lyase...), certains transporteurs (AMTs, SULTR pour *SULfate Transporter*, AKT...), les voies de signalisation hormonale ou la réponse à la lumière (Diaz *et al.*, 2011 ; Shin *et al.*, 2011 ; Denison *et al.*, 2011). Il participe ainsi pleinement à l'édification d'un réseau de régulation contrôlé par la lumière et les mécanismes

photosynthétiques, permettant de coordonner les différents métabolismes primaires (azote, carbone, soufre) en fonction des nutriments, de l'énergie et du pouvoir réducteur disponibles.

L'activité de la NR varie également au cours d'un cycle nycthéral, en présentant une forte augmentation durant la première partie de la phase diurne. Deux facteurs sont à l'œuvre dans cette stimulation. D'une part, l'expression des gènes codant la NR est soumise à une régulation circadienne via le gène *CCA1*, permettant la mise en place de la machinerie de réduction dès la fin de la nuit, et augmentant ainsi la NUE dès la levée du jour (Harmer, 2000 ; Lillo *et al.*, 2001 ; Gutiérrez *et al.*, 2008). D'autre part, la lumière stimule directement l'expression des gènes *NIA* par le biais de phytochromes (PhyA à PhyE suivant le type de lumière) via les FTs *HY5* et *HYH*, en présence de saccharose comme produit de la photosynthèse (Jonassen *et al.*, 2007 ; Lillo, 2008), mais participe également à la réactivation des protéines déjà présentes. La baisse d'activité observée lors de la phase nocturne vient de l'inactivation de la protéine grâce au mécanisme de phosphorylation et de liaison aux protéines 14-3-3.

L'activation post-transcriptionnelle de la NR est également sous l'influence de facteurs physiologiques en lien avec la photosynthèse. Plusieurs acteurs issus de la machinerie photosynthétique sont connus pour agir sur l'activation de la NR, tels que l'acidification du cytosol et certains sucres et oses-phosphorylés (saccharose, tréhalose-6-phosphate...) (Provan and Lillo, 1999 ; Lillo, 2008 ; Reda, 2013). A l'heure actuelle, ni la ou les molécules signales, ni le mode de transfert de ce signal provenant du chloroplaste vers le cytosol où est active la NR, ni la voie de transduction de ce signal ne sont déterminés. Certains aminoacides (Gln, Glu et GABA) semblent également affecter l'expression des gènes *NIA* ainsi que l'activité NR, sans toutefois changer drastiquement l'état d'activation des protéines présentes. Leur impact serait donc probablement dû à la diminution de l'absorption du NO_3^- qu'engendre leur présence dans la rhizosphère (Barbosa *et al.*, 2010 ; Reda, 2013). Une déficience en soufre semble également réguler négativement la NRA ainsi que le taux de transcrits des gènes *NIA*, de par l'induction d'une accumulation d'aminoacides (Friedrich and Schrader, 1978 ; Migge *et al.*, 2000 ; Prosser *et al.*, 2001 ; Kaur *et al.*, 2010). Enfin, le NO pouvant être issu de la réduction du NO_2^- par la NR ou de l'activité d'une NO synthase (NOS) hypothétique (Gas *et al.*, 2009 ; Moreau *et al.*, 2010), induit également une inhibition de l'activité NR (Rosales *et al.*, 2011a). Rosales et associés proposent une possible implication des polyamines dans un premier temps comme stimulateur de la synthèse de NO (Tun, 2006) et de la liaison des protéines 14-3-3 à la NR phosphorylée, puis dans un second temps comme molécule stimulant le déplacement de l'équilibre des protéines 14-3-3 des NR vers les H^+ -ATPases induisant indirectement une réactivation des NR (Rosales *et al.*, 2011b).

Dans un grand nombre d'études, l'activité NR observée *in vivo* est inférieure à celle mesurée au sein d'extraits protéiques. L'interprétation la plus courante semble être liée à la fourniture en pouvoir réducteur ($\text{NADH} + \text{H}^+$), qui serait *in planta* le principal facteur limitant de l'activité NR. Cette hypothèse corrobore d'une part avec la régulation positive induite par le NO_3^- sur la quantité de transcrits et de protéines synthétisées *de novo* de deux enzymes clefs du cycle des pentoses phosphates producteur de NAD(P)H (Redinbaugh and Campbell, 1998), et d'autre part avec l'effet d'hystérésis du NADH sur la vitesse de production de NO_2^- (Lillo and Ruoff, 1992).

- **Mécanismes d'assimilation de l'ammonium**

L'ammonium intracellulaire peut provenir de la réduction des nitrates, comme nous venons de le voir, ou de son absorption directe dans la rhizosphère, et de différentes voies métaboliques à l'œuvre dans la cellule. Chez les plantes de type C3, la photorespiration représente ainsi la principale source de NH_4^+ dans les organes photosynthétiques. En effet, le relargage de NH_3 issu de l'action de la glycine décarboxylase (GDC, EC 1.4.4.2) dans la mitochondrie produit au moins dix fois plus de NH_4^+ que le processus de réduction du NO_3^- , même si une petite partie peut être perdue sous forme de NH_3 gazeux (Novitskaya *et al.*, 2002 ; Oliveira, 2002 ; Tcherkez and Hodges, 2007; Bauwe *et al.*, 2010 ; Maurino and Peterhansel, 2010). De même, durant les phases ontogéniques de remobilisation intense de l'azote (sénescence, remplissage des graines, germination...), les voies du catabolisme des protéines produisent une forte quantité de NH_4^+ . D'autres processus comme la biosynthèse des lignines relarguent également de NH_4^+ (Bernard and Habash, 2009).

L'accumulation toxique d'ions NH_4^+ est évitée par une assimilation ou réassimilation rapide de ce dernier par la Gln synthétase (GS, EC 6.3.1.2) au sein du cycle GS / GOGAT, qui représente donc une étape primordiale du métabolisme de l'azote. Plus précisément, la GS catalyse de façon ATP-dépendante la fixation du NH_4^+ sur le groupe δ -carboxyle du Glu pour former la Gln. Puis la GOGAT (Glu synthase ou Gln 2-oxoglutarate aminotranférase) catalyse la conversion d'une molécule de Gln et d'une molécule de 2-oxoglutarate en deux molécules de Glu, réapprovisionnant ainsi la GS en Glu et produisant un Glu supplémentaire pour la synthèse d'autres aminoacides.

Kumada et associés estiment que la GS est l'un des plus vieux gène fonctionnel existant puisqu'on le retrouve également chez bon nombre de procaryotes (Kumada *et al.*, 1993). Chez les plantes, il existe deux isoformes de la GS, une cytosolique (GS1) et l'autre plastidiale (GS2) codées par des gènes nucléaires distincts. L'isoforme plastidiale GS2 est codée par un seul gène (*GLN2* chez *A. thaliana*), alors que de deux à cinq gènes codent la GS1 cytosolique (*GLN1.1* à *GLN1.5* chez *A. thaliana*). L'abondance relative de ces isoformes varie selon les organes d'une même plante et selon les espèces, en fonction du type photosynthétique ou des conditions environnementales. La GS plastidiale intervient principalement dans les mécanismes d'assimilation primaire et de recyclage du NH_4^+ issu de la photorespiration. Le rôle de la GS cytosolique est, par contre, moins bien caractérisé, plus particulièrement pour les espèces présentant une assimilation foliaire majoritaire (Bernard and Habash, 2009). Cette isoforme est prédominante dans les tissus peu ou pas photosynthétiques (*e.g.* les tissus parenchymateux des racines, tiges et feuilles sénescentes), et son abondance relative au niveau des tissus vasculaires (parenchyme xylémien et phloémien et cellules intermédiaires où l'azote est échangé entre différents types cellulaires; Kichey *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2006) semble indiquer qu'elle jouerait un rôle dans le transport de l'azote et plus particulièrement lors de la remobilisation de l'azote provenant du catabolisme des protéines et des aminoacides (désassemblage de l'appareil photosynthétique...). L'isoforme cytosolique pourrait également jouer un rôle important dans l'assimilation du NH_4^+ au sein des organes puits comme les graines en développement (Bernard and Habash, 2009), le NH_4^+ provenant dans ce cas du catabolisme de l'Asparagine (Asn) chez un large panel de plantes (Lea *et al.*, 2007).

Plusieurs mécanismes de régulation permettent d'adapter l'activité des GSs à l'assimilation ou la réassimilation rapide du NH_4^+ . La diversité des gènes impliqués dans la synthèse de la GS cytosolique, les formes de régulation transcriptionnelle et les mécanismes d'adressage cellulaire sont considérés comme déterminant pour cette régulation (Cren and Hirel, 1999). Il existe également des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle tel que la liaison de la protéine GS phosphorylée à une protéine 14-3-3 qui participerait à leur inactivation, sous contrôle de la lumière et du ratio ATP/AMP (Finnemann and Schjoerring, 2000 ; Riedel *et al.*, 2001 ; Lima *et al.*, 2005). La GS étant une étape clef, voire l'enzyme centrale du métabolisme azoté, de nombreux acteurs métaboliques, ontogéniques et environnementaux participent à sa régulation, qui s'avère différentielle en fonction des isoformes. L'identification des régulateurs et de leur mode d'action est de ce fait plus complexe, puisqu'elle nécessite l'intégration de multiples paramètres. Des études ont démontré l'impact de la lumière via les phytochromes, du statut carboné via des métabolites clefs (saccharose, 2-oxoglutarate) et de la nutrition et du statut azotés sur la transcription ou l'activité des GSs (Oliveira *et al.*, 2001 ; Mifflin and Habash, 2002). Une étude récente basée sur l'identification *in silico* de co-expressions positives des différents gènes codant les GSs avec des gènes impliqués dans le métabolisme primaire et la photosynthèse a mis en lumière les corrélations supposées entre les GSs et les différents acteurs du statut carboné et azoté de la plante. Ainsi, l'expression du gène codant pour la GS2 plastidiale est fortement corrélée à celle des gènes impliqués dans la photosynthèse, le métabolisme énergétique, le métabolisme carboné et le métabolisme azoté, sa régulation étant donc au carrefour des différents grands métabolismes primaires. Les gènes codant pour les GS1 sont quant à eux différemment régulés et principalement corrélés à des gènes impliqués dans le métabolisme de mise en réserve (amidon, lipides...), des protéines pariétales et du TCAP (Swarbreck *et al.*, 2010).

La GOGAT est présente sous deux formes localisées dans les chloroplastes, une utilisant la ferrédoxine comme donneur d'électrons (Fd-GOGAT, EC 1.4.1.7) et représentant 95 % de l'activité GOGAT des tissus photosynthétiques, et l'autre dépendante du NADH (NADH-GOGAT, EC 1.4.1.14) (Coruzzi, 2003). Chez *A. thaliana*, la Fd-GOGAT est codée par deux gènes *GLU1* et *GLU2* majoritairement exprimés dans le mésophylle et dans les cellules compagnes du phloème. Le gène *GLU1*, sensible à lumière et au saccharose, code pour une Fd-GOGAT principalement impliquée dans l'utilisation du NH_4^+ issu de la photorespiration. La NADH-GOGAT, est quant à elle codée par le gène *GLT*, principalement exprimé dans les racines et les cellules compagnes du phloème. Elle jouerait un rôle non négligeable, malgré sa faible activité, dans la synthèse et la translocation des aminoacides issus de la réduction primaire de l'azote ou du recyclage de l'azote remobilisé (Lancien *et al.*, 2002 ; Potel *et al.*, 2009).

Le rôle de la Glu dehydrogenase (GDH) a longtemps été suspecté dans le processus d'assimilation de l'azote chez les plantes, en raison de la présence de deux isoformes localisées dans les mitochondries (NADH-GDH, EC 1.4.1.2) et les chloroplastes (NADPH-GDH, EC 1.4.1.4), potentiellement capables de catalyser l'amination du 2-oxoglutarate à partir de NH_4^+ . Des études ont clairement démontré que cette enzyme catalyse principalement la désamination oxydative du Glu en 2-oxoglutarate et en NH_3 au sein de la mitochondrie, de façon NADH-dépendante et qu'elle joue un rôle important dans la fourniture de squelettes carbonés aux GOGATs et au TCAP, majoritairement lors de période de stress ou de sénescence (Robinson *et al.*, 1991 ; Hodges, 2002 ; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006b ; Watanabe *et al.*, 2011).

- **Synthèse des principaux aminoacides**

Suite à la réduction de l'azote inorganique et à l'incorporation de l'ammonium au sein du cycle GS/GOGAT, le mécanisme de la transamination (transfert réversible du groupement amine ou amide d'un aminoacide sur un α -cétoacide) assure la formation de la majorité des aminoacides par action d'aminotransférases catalysant l'incorporation d'une fonction amine provenant du glutamate ou amide issue de la glutamine sur un α -cétoacide. La spécificité provient alors de l'acide α -cétonique utilisé lors de la synthèse et de l'aminotransférase spécifique catalysant la réaction. Nous citerons les réactions les plus courantes, telles que la synthèse du glutamate issue de la désamidation de la Gln suivie de l'amination du 2-oxoglutarate via la GOGAT, celle de l'alanine (Ala) issue de la transamination du pyruvate par le Glu via l'alanine aminotransférase (AlaAT, EC 2.6.1.2) ou encore celle de l'aspartate (Asp) issue de la transamination de l'oxaloacétate par le Glu via l'aspartate aminotransférase (AspAT, EC 2.6.1.1). Certains aminoacides peuvent également porter leur(s) fonction(s) amine(s) sur un β -carbone (β -Ala) ou un γ -carbone (GABA). Enfin, quelques aminoacides sont issus d'autres aminoacides par le biais de réactions de conversion. C'est le cas de la conversion de la glycine (Gly) en sérine (Ser) issue de l'action conjointe de la glycine décarboxylase (GDC) et de la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT, EC 2.1.2.1) lors de la phase mitochondriale de la photorespiration, de la synthèse de la proline à partir du glutamate, de la synthèse de l'Asn via l'AS (pour Asn synthétase) par désamidation de la Gln suivie de l'amination ATP-dépendante de l'Asp (EC 6.3.5.4) voire marginalement par l'utilisation de NH_4^+ (EC 6.3.1.1) (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006b), ou encore de la synthèse de l'arginine via celle de l'ornithine puis de la citrulline (Guignard, 2004 ; Lea and Azevedo, 2007 ; Jander and Joshi, 2009).

Au sein des aminoacides, on distingue ceux caractérisés par un de leurs constituants. C'est le cas des aminoacides soufrés, porte d'entrée du soufre issu de l'assimilation des sulfates du sol dans le métabolisme du carbone et de l'azote, régi par la synthèse de la cystéine (Cys) puis de méthionine (Met). Ces aminoacides sont impliqués dans la synthèse du Glutathion (GSH) et d'autres composés soufrés, comme les GLS et les S-alkylcystéine sulfoxides (Stoewsand, 1995 ; Saito, 2000 ; Jones, 2004). C'est également le cas des aminoacides à chaîne ramifiée (BCAAs pour *Branched Chain AminoAcids*) que forment la valine (Val), l'isoleucine (Ile) et la leucine (Leu) par l'action de BCATs (pour *branched-chain aminotransferases*) qui jouent également un rôle dans la synthèse des GLS (Knill *et al.*, 2008). Nous citerons enfin les aminoacides à noyau aromatique constitués de la phénylalanine (Phe), de la tyrosine (Tyr) et du tryptophane (Try) issus de la condensation du phosphoénolpyruvate (PEP) avec l'érythrose-4-phosphate, puis empruntant la voie du shikimate conduisant à la synthèse du chorismate à l'origine de ces 4 aminoacides. Cette classe d'acides est considérée comme centrale pour un certain nombre de voies métaboliques puisqu'elle est impliquée dans la voie du shikimate produisant les précurseurs de bon nombre de métabolites secondaires aromatiques, de composés phénoliques et de vitamines. Ces aminoacides s'avèrent également servir de précurseurs à la synthèse de phytohormones (AIA, salicylate...) (Tzin, 2010 ; Maeda and Dudareva, 2012).

On compte plus de 300 types d'acides chez les végétaux, plus ou moins spécifiques de certaines espèces, mais la plupart sont apparentés à des métabolites secondaires et correspondent dans la majorité des cas, à des dérivés d'acides d'un point de vue biosynthétique. Seuls 21 acides sont considérés comme constitutifs puisqu'ils entrent dans

la composition des protéines ou que leurs précurseurs interviennent dans les voies métaboliques essentielles, comme le TCAP ou la glycolyse. À noter que la Gln contribue également à la formation du carbamyl-phosphate utilisé dans la synthèse de l'arginine et des nucléotides, et qu'un petit nombre d'acides aminés (ornithine, arginine, méthionine, lysine) sont impliqués dans la synthèse des polyamines (Bouchereau *et al.*, 1999 ; Kusano *et al.*, 2008 ; Alcázar *et al.*, 2010). Quoi qu'il en soit, le pool d'acides aminés est déterminant pour un grand nombre de voies métaboliques au carrefour des métabolismes carboné, azoté et soufré, ce qui nécessite un contrôle rigoureux de leur synthèse et de leur utilisation en fonction du statut nutritionnel, des signaux développementaux et environnementaux et des possibles stress biotiques et abiotiques.

- **Les mécanismes de transport de l'azote**

Comme nous l'avons vu précédemment, une grande partie de l'azote inorganique absorbé est transférée sous forme de NO_3^- par le xylème en vue de son assimilation au sein des organes foliaires. Cette translocation est réalisée grâce à certains transporteurs NRTs spécifiques de la charge et la décharge xylémienne (Li *et al.*, 2010 ; Dechorgnat *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2012). Le NO_3^- peut également être chargé dans les tubes criblés du phloème en vue de son transport au sein du système racinaire via le transporteur NRT1.9 (Wang and Tsay, 2011) ou lors de la remobilisation foliaire via NRT1.7 (Fan *et al.*, 2009). Finnemann et Schjoerring ont également montré que, chez le colza, en conditions variables de fertilisation azotée, une part non négligeable de l'azote était transférée vers les parties aériennes sous forme de NH_4^+ (Finnemann and Schjoerring, 1999), impliquant probablement des transporteurs de type AMTs dans la charge et la décharge xylémienne (Williams and Miller, 2001 ; Yuan *et al.*, 2007). Cet état des lieux semble somme toute assez inhabituel puisque chez la plupart des espèces le NH_4^+ est assimilé rapidement par les racines.

Suite à l'assimilation de l'azote inorganique, les acides aminés deviennent la principale forme de transport longue distance de l'azote au sein de la plante, même si certains peptides (GSH...) et quelques uréides peuvent être véhiculés chez certaines espèces par le phloème (Schubert, 1986 ; Rentsch *et al.*, 2007 ; Tegeder and Rentsch, 2010). Les acides aminés libres peuvent être fortement accumulés au sein des chloroplastes, du cytosol et du compartiment vacuolaire des cellules racinaires et des feuilles sénescents avant d'être véhiculés via le phloème (majoritairement) ou le xylème suivant leur lieu de synthèse, vers les organes puits.

Le chargement phloémien est effectué via un système de transport actif secondaire (symport acides aminés/ H^+) utilisant un large panel de transporteurs souvent spécifiques de tissus ou d'organes et du type d'acides aminés (Lalonde *et al.*, 2003). Les familles de transporteurs AAPs, ProTs et LHTs, déjà décrites dans le phénomène d'absorption, sont également impliquées dans la translocation des acides aminés, auxquelles s'ajoutent les familles de transporteurs d'acides aminés cationiques (CATs) ou neutres et aromatiques (ANTs), d'acides aminés, de polyamines et de choline (APCs) et d'oligopeptides (OPTs) (Liu and Bush, 2006 ; Hirner, 2006 ; Rentsch *et al.*, 2007 ; Masclaux-Daubresse, 2008 ; Lehmann *et al.*, 2010 ; Tegeder and Rentsch, 2010 ; Tegeder, 2012). Certains transporteurs sont spécialisés dans le chargement et le déchargement du phloème, d'autre dans le transfert des acides aminés provenant du xylème vers le phloème (Pate *et al.*, 1975 ; Zhang *et al.*, 2010). Parmi tous ces transporteurs putatifs, seul un petit nombre a

été caractérisé de façon fonctionnelle pour leur rôle effectif dans le transport des aminoacides. Chez le colza, trois transporteurs (BnAAP1, BnAAP2 et BnAAP6) ont ainsi été identifiés comme jouant un rôle dans le chargement du phloème (Tilsner *et al.*, 2005).

Bien qu'il existe un large panel de transporteurs, spécifiques ou non, capables de transporter à travers les membranes toutes sortes d'acides aminés, seuls le Gln, le Glu, l'Asp et l'Asn sont majoritairement accumulés dans le phloème de nombreuses plantes (Riens *et al.*, 1991 ; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006b ; Caputo *et al.*, 2009). La sève phloémienne de colza, majoritairement constituée de Gln et Glu, peut atteindre des concentrations de l'ordre de 500 à 650 mM (Lohaus and Moellers, 2000 ; Tilsner *et al.*, 2005 ; Balint and Rengel, 2011). La co-expression des gènes codant pour les deux GOGAT, la GS1 et l'AS dans les cellules compagnes du phloème peut expliquer ce phénomène, puisqu'elle tend à démontrer que les principales formes d'azote réduites véhiculées (Gln, Glu, Asn et Asp) sont en partie synthétisées dans les tissus du phloème en vue de leur exportation (Potel *et al.*, 2009 ; Lothier *et al.*, 2011 ; Gaufichon *et al.*, 2013).

La décharge des aminoacides provenant du phloème apparaît comme l'étape finale de la translocation longue distance des composés azotés. Suivant les organes et tissus considérés, la décharge peut être de type symplastique, comme dans les apex racinaires (Stadler, 2005), ou de type apoplastique via des transporteurs comme c'est le cas dans la graine entre les tissus de génération n+1 (embryon ou albumen) et les tissus de générations n (téguments ou nucelle) (Rochat and Boutin, 1991 ; Lalonde *et al.*, 2003).

2.2.3 Schéma d'utilisation de l'azote chez le colza

Plusieurs travaux du laboratoire d'Écophysiologie Végétale, Agronomie et Nutrition N, C, S de l'Université de Caen Basse-Normandie, basés sur l'utilisation d'un traceur isotopique ¹⁵N, ont permis de suivre la cinétique d'absorption et d'utilisation des nitrates de la reprise de végétation (stade C1) jusqu'à la fin du remplissage des graines (stade G5) chez des plantes cultivées en conditions contrôlées (Rossato *et al.*, 2001) ou en plein champ (Malagoli *et al.*, 2005 ; Gombert *et al.*, 2010). Ces études ont ainsi permis de caractériser les flux d'azote au cours du cycle ontogénétique du colza d'hiver après la période de vernalisation.

Durant la phase de développement automnal (mise en place de la rosette), la demande en azote du colza est relativement faible puisque la plante n'accumule sur cette période que 25 à 30 % de l'azote absorbé total (Rathke *et al.*, 2006), alloué principalement aux feuilles de la rosette et au système racinaire. Une partie non-négligeable pourra par contre être perdue durant l'hiver par le biais des feuilles sénescentes (pertes allant jusqu'à 100 kg N ha⁻¹) et seulement un quart de cet azote perdu pourra être réabsorbé au printemps (Dejoux *et al.*, 2000).

À la reprise de végétation, la demande devient très élevée, les feuilles constituant alors le principal puits d'azote accumulant de 50 à 75 % de l'azote absorbé (Schjoerring *et al.*, 1995 ; Rossato *et al.*, 2001 ; Chamorro *et al.*, 2002 ; Malagoli *et al.*, 2005 ; Gombert *et al.*, 2010). La

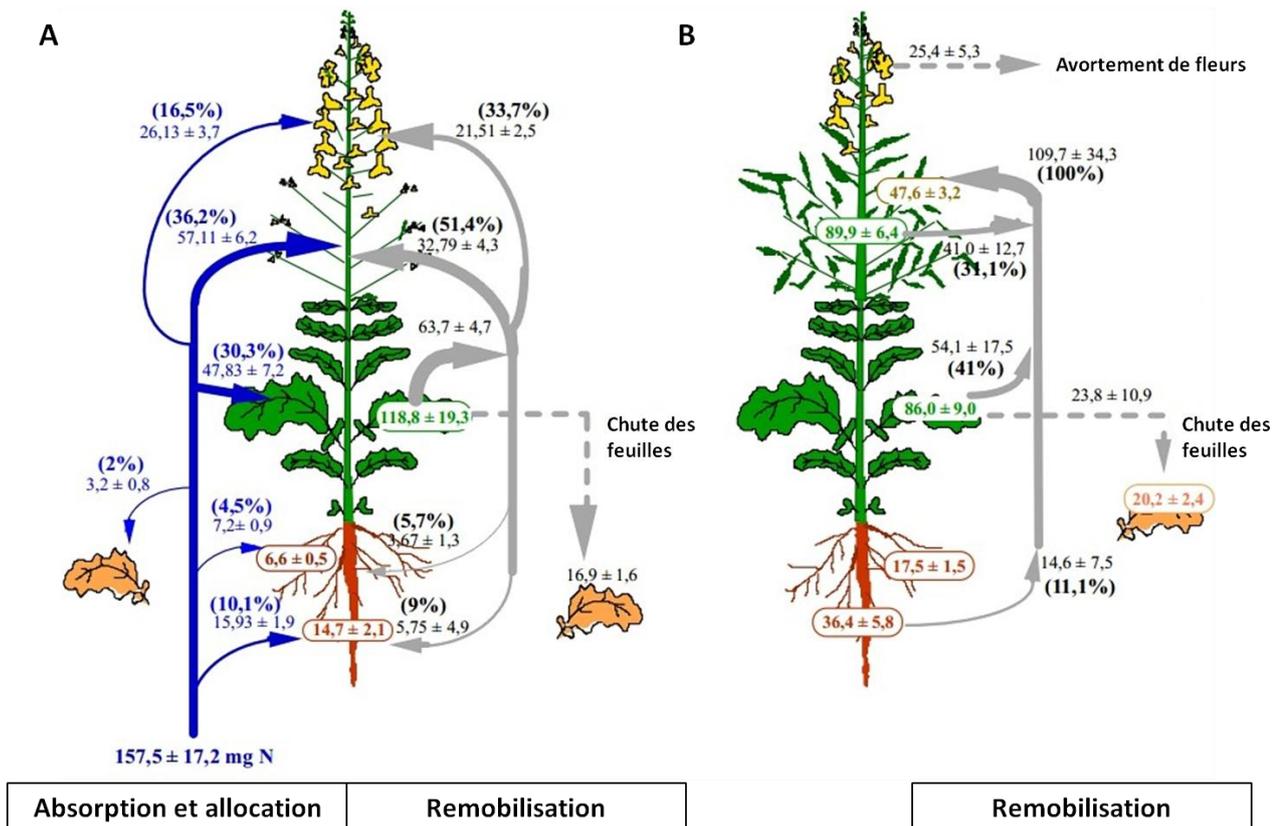


Figure 36 : Bilan des flux d'azote chez le colza (Rossato *et al.*, 2001)

Les boîtes représentent la quantité d'azote (en mg N plante⁻¹) au sein de chaque organe en début d'expérimentation (A, C1 ; B, G1) ; les chiffres entre parenthèses indiquent la répartition de l'azote entre organes en % de l'azote absorbé (en bleu) ou endogène (en gris) ; moyenne ± ET, n=6.

A : bilan des flux d'azote exogènes (en bleu) et endogène (en gris) de la reprise de végétation (C1) à la fin de la floraison (F-G1)

B : bilan des flux d'azote endogènes (en gris) du début de la formation des siliques (G1) aux graines colorées (G5). Les chiffres entre parenthèses correspondent à la participation de chaque organe au remplissage des siliques et des graines en azote.

rapidité d'élaboration de nouvelles feuilles et la quantité de biomasse produite à l'échelle de la plante entière avant la floraison sont d'ailleurs déterminantes quant à la future biomasse de siliques (Habekotté, 1993). Au cours de la montaison et de la floraison (**Fig. 36A**), la tige de colza cultivés en conditions de fertilisation optimale devient l'organe d'accumulation principal (36 %), devant les feuilles (30 %), les inflorescences (16,5 %), le pivot racinaire (10 %), les racines secondaires (4,5 %) et les feuilles tombées (2 %) (Rossato *et al.*, 2001). La quantité d'azote accumulée dans la tige est maximale au début de la floraison, quelque soit le régime de fertilisation azotée (Gombert *et al.*, 2010). Pendant cette phase du cycle, l'accumulation de protéines de stockage (VSP) dans les feuilles, la tige et le pivot racinaire permet à la plante de stocker transitoirement une partie de l'azote provenant de la sénescence séquentielle des feuilles, ces deux phénomènes étant médiés par le méthyl jasmonate (MeJA, étudié via traitement exogène mais non *in planta*) et l'ABA produit par les bourgeons apicaux ou les feuilles sénescents (Rossato *et al.*, 2002 ; Noquet *et al.*, 2004). On peut donc considérer qu'une première phase de remobilisation a lieu à ce moment, l'azote issu des feuilles les plus âgées étant remobilisé vers les nouvelles feuilles, et les organes de stockage transitoire.

Durant la phase de formation des siliques puis de remplissage des graines (**Fig. 36B**), où une modification importante des relations sources/puits a lieu puisque les siliques deviennent le seul organe puits, deux cas de figures semblent être possibles. Plusieurs études ont mis en évidence une réduction drastique de l'absorption de l'azote au moment de la floraison, le remplissage des graines étant dans ce cas entièrement dépendant des capacités de remobilisation de la plante (Gabrielle *et al.*, 1998 ; Rossato *et al.*, 2001 ; Malagoli, 2004). L'azote remobilisé en conditions de fertilisation optimale (48 % de l'azote total du colza) provient alors de la sénescence "monocarpique" des feuilles liée à l'apparition des organes reproducteurs (36 à 40 %), mais également des organes d'accumulation temporaire que sont la tige (31 à 34 %), l'inflorescence dont la paroi des siliques (17 à 22 %) et le pivot racinaire (8 à 11 % ; Rossato *et al.*, 2001 ; Malagoli *et al.*, 2005). Les VSP contenues dans ces organes sont de ce fait complètement hydrolysées. Sur cette même période, 16 % de l'azote total est perdu par le biais des feuilles sénescents, et 9 % par celui des fleurs avortées. Parallèlement, d'autres travaux s'accordent à dire qu'une absorption d'azote, bien que restreinte, a lieu durant la phase de remplissage des graines, représentant de 10 à 30 % de l'azote absorbé total (Malagoli *et al.*, 2005 ; Berry *et al.*, 2010 ; Gombert *et al.*, 2010). Les nitrates nouvellement absorbés seraient principalement assimilés dans la tige, les feuilles étant à ce stade quasiment toutes tombées ou fortement sénescents. Seulement 30 % de cet azote nouvellement assimilé seraient au final alloués aux graines, démontrant ici aussi l'importance de la remobilisation dans le mécanisme de remplissage des graines. Les différences observées au niveau de la fenêtre d'absorption de l'azote peuvent être attribuables, d'une part, à l'impact du mode de culture (culture hydroponique en condition contrôlée vs culture en plein champ) et au statut physiologique de la plante (déséquilibre sources/puits, ombrage du à la canopée...), et d'autres part, à la quantité de fertilisants azotés apportée.

En effet, l'absorption post-floraison serait amplifiée lors d'apports sub-optimaux de fertilisants azotés (Schjoerring *et al.*, 1995 ; Gombert *et al.*, 2010). Sachant que les capacités photosynthétiques du colza durant la période de détermination du nombre de graines sont dépendantes de la nutrition azotée (Drecker *et al.*, 2000), il est possible de relier l'amplification de l'absorption de l'azote post-floraison à une fourniture plus importante au système racinaire

de squelettes carbonés et d'énergie issus de la photosynthèse vers le système racinaire. Cette hypothèse est d'ailleurs en accord avec les travaux de Lejay et associés qui ont obtenu une restauration partielle de l'influx de NO_3^- et de l'expression du transporteur NRT2.1 après un apport racinaire nocturne en saccharose (Lejay *et al.*, 1999). Toutefois, Berry et collaborateurs ont soutenu l'hypothèse que le rendement en graines est majoritairement corrélé à la remobilisation lors de forts apports d'intrants azotés et qu'à l'inverse, en condition de fertilisation limitée, le rendement en graines serait plus fortement corrélé à l'absorption post-floraison de l'azote (Berry *et al.*, 2010). Ces travaux ont été contredits depuis par Ulas et associés qui ont démontré que la quantité d'azote absorbée durant la phase reproductive est déterminante pour le rendement potentiel lors de forts apports d'intrants azotés (Ulas *et al.*, 2013). Gombert et associés tempèrent quant à eux ces résultats en démontrant que le timing de fourniture d'azote (apport automnale, apport printanier) et la structuration des relations sources/puits qui en découlent semblent être plus déterminant pour atteindre une forte NUE que la quantité d'azote fournie (Gombert *et al.*, 2010).

La capacité du colza à remobiliser l'azote contenu dans la biomasse végétative semble être dépendante de la présence d'organes doués d'une importante force de puits. En effet, les feuilles tombées durant le phase de développement végétatif ne remobilisent que 30 à 60 % de leur azote (il reste 2,5 à 3,5 % N au moment de la chute), alors que les feuilles tombant durant la période de remplissage des graines parviennent à en remobiliser 70 % en moyenne (≈ 2 % N au moment de la chute) (Schjoerring *et al.*, 1995 ; Malagoli *et al.*, 2005). La faible efficacité globale de valorisation de l'azote absorbé alloué aux tissus récoltables serait due à une limitation de la force de puits plus qu'à une faible disponibilité en azote (Rossato *et al.*, 2001). L'âge des feuilles est également mis en cause puisque les feuilles basales tombent en moyenne deux fois plus vite que les feuilles du haut de la canopée. La faible NUE du colza s'expliquerait dans ce cas par une mauvaise synchronisation entre la remobilisation de l'azote foliaire vers des organes puits forts tels que les siliques et la chute des feuilles médiée par la dérégulation des facteurs hormonaux ou l'atténuation du rayonnement incident du au développement des inflorescences et des siliques (Malagoli *et al.*, 2005). Desclos et collaborateurs posent quant à eux l'hypothèse qu'une plante s'étant développée en condition limitée en azote présenterait des feuilles plus compactes avec de solides tissus structuraux alors qu'une feuille développée lors d'une période de consommation de luxe serait plus apte à remobiliser rapidement son azote lors de limitations azotées soudaines (Desclos *et al.*, 2009). Ce que corrobore les travaux de Gombert et associés en démontrant que la remobilisation foliaire est dépendante de la présence de puits (sink-limited) lors d'une consommation de luxe, alors qu'elle est dépendante de la présence de sources (source-limited) lors de faibles disponibilités en azote (Gombert *et al.*, 2010). La remobilisation de l'azote semble donc être régulée de façon complexe chez le colza par un certain nombre de facteurs environnementaux (fertilisation azotée, teneur en CO_2 , disponibilité en eau, luminosité...) ayant un impact direct sur la structuration des relations sources/puits entre les différents organes (Gombert *et al.*, 2010 ; Franzaring *et al.*, 2011, 2012) et donc sur la disponibilité en azote global de la plante (Ulas *et al.*, 2013). L'impact des conditions environnementales et des pratiques culturales apparaît ainsi comme étant largement prédominant comparé aux variations génotypiques d'efficacité de remobilisation de l'azote (Ulas *et al.*, 2013).

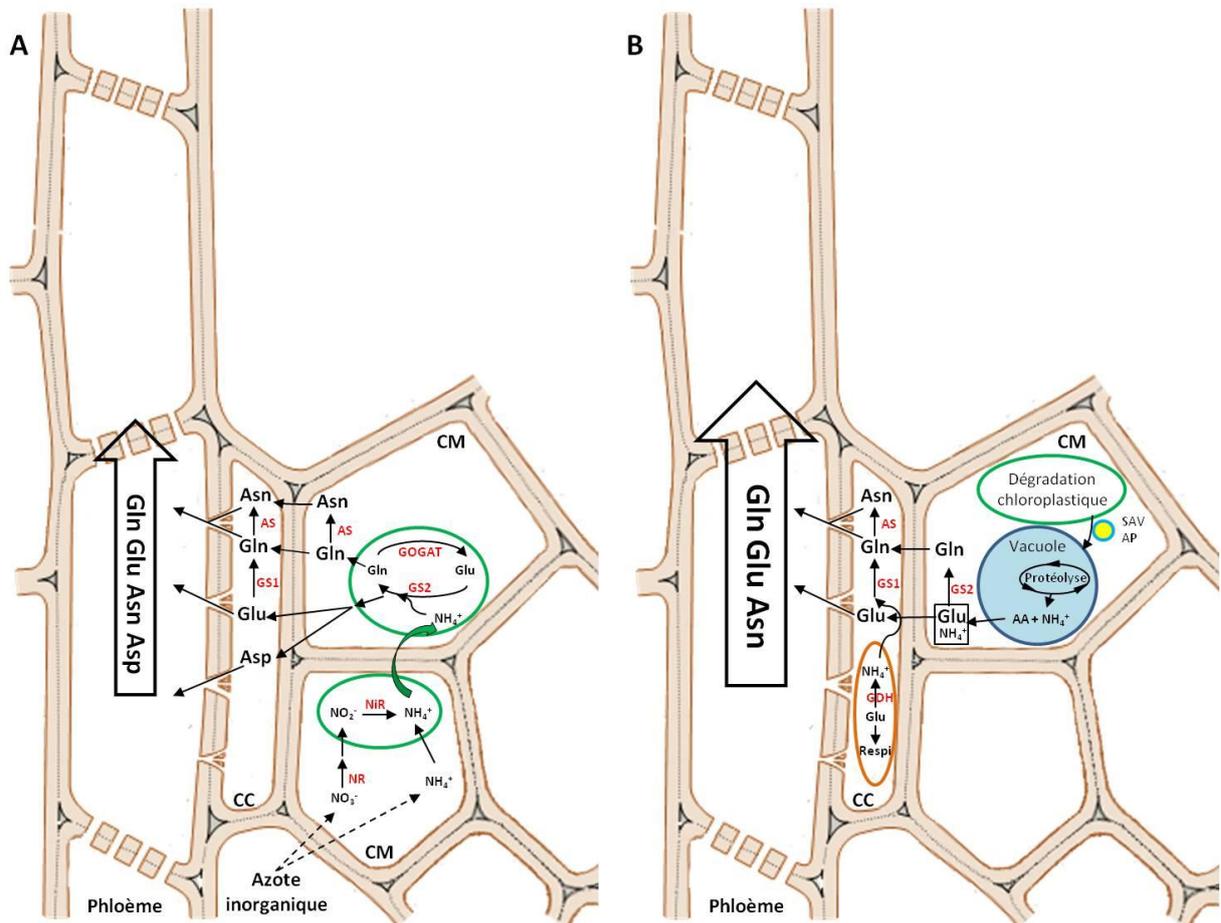


Figure 37 : Représentation schématique des principaux enzymes impliqués dans le métabolisme azoté primaire au sein d'une jeune feuille (A) et d'une feuille sénescente (B) (d'après Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010 et Taiz and Zeiger, 2010)

CM, cellule du mésophylle ; CC, cellule compagne du phloème ; ovals verts, plastes ; cercle bleu, grande vacuole ; ovale marron, mitochondrie ; Respi, respiration cellulaire

A : la Nitrate Réductase (NR) et l'Asparagine Synthétase (AS) sont localisées dans le cytosol ; la Nitrite Réductase (NiR), la Glutamine Synthétase 2 (GS2) et la Glutamate synthase (GOGAT) sont localisées dans les chloroplastes des cellules du mésophylle ; la GS1 et l'AS sont localisées dans le cytosol des cellules compagnes.

B : Les produits issus de la dégradation des plastes sont acheminés jusqu'à la vacuole centrale via les SAV (Senescence-Associated Vacuoles) et les autophagosomes (AP). Le recyclage des aminoacides a lieu dans le cytosol des cellules du mésophylle (GS2) et dans les cellules compagnes (AS et GS1 sont cytosoliques, GDH est mitochondriale).

Enfin, il est important de noter que le schéma d'utilisation de l'azote chez le colza est finement lié au métabolisme du soufre. En effet, une nutrition limitée en soufre induit une diminution de la NUE et du taux de protéines dans les graines (Fismes *et al.*, 2000) et principalement si cette limitation a lieu durant le stade rosette ou la phase de débourrement (Dubousset *et al.*, 2010). Une déficience marquée en soufre induit également une mobilisation nette vers le système racinaire des réserves azotées et soufrées issues de la protéolyse et des réserves vacuolaires du compartiment foliaire. Cette mobilisation conduit à une accumulation d'azote (aminoacides et NO_3^-) et à une prise de biomasse des racines, et ainsi à l'extension de surface de sol explorée (Abdallah *et al.*, 2010 ; Dubousset *et al.*, 2010 ; Lee *et al.*, 2012).

2.2.4 Remobilisation de l'azote

Pendant la phase de croissance, les feuilles puits du sommet de la canopée nécessitent l'apport constant de composés carbonés, azotés et soufrés provenant de l'assimilation de sources exogènes ou, comme nous l'avons vu, d'une première remobilisation des ressources des organes végétatifs. Ces tissus foliaires sont généralement dédiés aux fonctions d'incorporation et d'assimilation primaire de l'azote et du carbone (gènes *NR*, *NiR*, *GS2* et *Fd-GOGAT* fortement exprimés ; **Fig. 37A**). L'azote organique est de ce fait pleinement engagé dans la mise en place de la machinerie photosynthétique (photosystème I et II, RuBisCO (pour Ribulose 1,5-Biphosphate Carboxylase / Oxygenase) au sein des chloroplastes, la RuBisCO pouvant constituer à elle seule 50 % des protéines solubles et 20 à 30 % de l'azote foliaire chez les plantes C3, c'est à dire la forme majeure de stockage de l'azote (Spreitzer and Salvucci, 2002 ; Feller *et al.*, 2007 ; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010 ; Whitney *et al.*, 2010). Ces feuilles connaissent ensuite une phase d'expansion caractérisée par l'accroissement de leur surface et l'augmentation de leur biomasse jusqu'à maturité.

Par la suite, ces feuilles devenues photosynthétiquement actives et autotrophes, passent du statut de puits à celui de sources et sont susceptibles de remobiliser ou tout du moins d'exporter de l'azote organique et des photoassimilats (**Fig. 37B**) (Turgeon, 2006). La durée de cette phase de transition où la feuille est mûre varie suivant les espèces et se distingue de la phase initiale de la sénescence foliaire où les processus de remobilisation s'enclenchent. S'ensuit une seconde phase dite de dégénérescence (désassemblage des composants cellulaires) puis une phase terminale caractérisée par la perte de l'intégrité cellulaire et la mort des cellules (Yoshida, 2003 ; Gombert *et al.*, 2006). La transition fonctionnelle d'un statut d'organe puits à celui d'organe source s'accompagne donc d'importants changements moléculaires, biochimiques et métaboliques coordonnés au niveau cellulaire et tissulaire et conduisant en fin de compte à la mort de l'organe considéré.

- **Les mécanismes de la sénescence foliaire**

La sénescence foliaire est souvent considérée comme un phénomène de mort cellulaire programmée (PCD pour *Programmed Cell Death*) puisqu'elle est génétiquement contrôlée,

chronologiquement déterminée et coordonnée au niveau cellulaire et tissulaire. Elle s'achève par la mort des cellules, le démantèlement des structures tissulaires et inexorablement par l'abscission et la chute physique de l'organe (Lim *et al.*, 2007 ; excepté dans le cas des feuilles marcescentes). Au cours de la sénescence, les feuilles s'engagent dans un processus de dégradation massive de leurs macromolécules (pigments, protéines, lipides, glucides, acides nucléiques), les composés issus de cette dégradation étant par la suite redistribués vers les organes en croissance. Dans le cas des composés azotés, il est possible de distinguer deux types de remobilisation, la première mobilisant les composés facilement mobilisables tels que les nitrates, les aminoacides et les protéines solubles cytosoliques et vacuolaires, la seconde correspondant au recyclage de l'azote nécessitant au préalable une dégradation des structures cellulaires et donc plus difficilement mobilisables.

Le jaunissement caractéristique, premier symptôme visuel de la sénescence, est imputable à la dégradation des chlorophylles et plus précisément à la dégradation précoce des membranes thylakoïdiennes. Les chloroplastes sont donc les premiers organites touchés, on parle alors de gérontoplastes du fait du nombre restreint de thylakoïdes et de l'accumulation de vésicules lipidiques (plastoglobules) chargées de triacylglycérols (Kaup, 2002). Leur dégradation s'accompagne de la réduction de la capacité photosynthétique de la plante, et donc d'une plus faible production de pouvoir réducteur (NAD(P)H, H⁺) et d'énergie (ATP), auquel s'additionne, par voie de conséquence, une diminution de l'assimilation du CO₂ amplifiée par la dégradation de la RuBisCO dès le début de la sénescence foliaire (Stessman *et al.*, 2002). Ainsi, l'énergie lumineuse n'est plus utilisée par les feuilles sénescentes pour la photosynthèse, mais est restituée à la plante sous forme d'excès d'énergie d'excitation, aboutissant à la formation de ROS au sein des plastes. Toutefois, la dégradation de la chaîne photosynthétique (et de la protéine D1 en particulier) inactive rapidement le flux linéaire d'électrons. Par la suite, le catabolisme des produits issus de la dégradation des protéines devient le principal producteur de ROS (glyoxysomes, mitochondries). Ces ROS sont de puissants oxydants responsables de nombreux dommages oxydatifs au niveau moléculaire (acides nucléiques, lipides...). Leur présence accrue au cours de la sénescence suggère l'implication du stress oxydatif dans ce phénomène (Doyle *et al.*, 2009 ; Khanna-Chopra, 2011). Une autre étape importante de la sénescence est la transition fonctionnelle des péroxysomes en glyoxysomes participant à la production de saccharose via le cycle du glyoxylate à partir des lipides issus de la perte de l'intégrité membranaire. Les mitochondries et les noyaux, du fait de leurs rôles respectifs dans le métabolisme énergétique et respiratoire et dans la transcription génique, restent fonctionnels jusqu'à un stade tardif de la sénescence (Yoshida, 2003).

La dégradation des protéines, constituant une source importante de composés mobilisables, est un processus complexe impliquant une multitude de voies protéolytiques localisées dans un ou plusieurs compartiments cellulaires. Le processus de protéolyse semble être, au moins en partie, initié dans les chloroplastes par l'accumulation de ROS qui agiraient directement sur l'intégrité des membranes et des protéines (RuBisCO, GS2 et chlorophylles...), mais également comme molécules signales du PCD (Zimmermann and Zentgraf, 2005 ; Foyer and Noctor, 2009 ; Khanna-Chopra, 2011). La dégradation proprement dite des protéines fait intervenir un certain nombre d'hydrolases et de peptidases (ou protéases), chaque compartiment possédant son propre jeu. On distingue donc une voie de dégradation chloroplastique, une voie cytoplasmique et nucléaire faisant intervenir le système ubiquitine-

protéasome, et une voie vacuolaire et autophagique (Liu *et al.*, 2008). La vacuole centrale représente le compartiment lytique le plus important, puisqu'elle renferme un grand nombre d'endo et d'exopeptidases. Néanmoins, de petites vacuoles spécifiques itinérantes font également office de vésicules autophagiques (SAVs pour *Senescence Associated Vacuoles*) et participent à l'acheminement et à la dégradation des protéines (RuBisCO, GS2...) dans les cellules chlorophylliennes. Un phénomène de macroautophagie induisant la formation d'autophagosomes (structure munie d'une enveloppe, capable d'enfermer des macromolécules ou des résidus d'organites) semble également à l'œuvre. Il participerait à la translocation de portions entières de la RuBisCO et de protéines du stroma non-dégradées jusqu'à la vacuole centrale où l'autophagosome serait alors dégradé (Thompson and Vierstra, 2005 ; Ishida and Yoshimoto, 2008 ; Wingler *et al.*, 2009). La sénescence foliaire fait également intervenir des activités protéolytiques spécifiques codées par les gènes *SAGs* (pour *Senescence Associated Genes*), induits uniquement lors de ce processus. A l'heure actuelle, on dénombre plus d'une centaine de gènes *SAGs* codant pour des hydrolases (ribonucléases, protéases, lipases...) dont certaines s'expriment spécifiquement dans les SAVs (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003 ; Guo *et al.*, 2004 ; Otegui *et al.*, 2005 ; Gombert *et al.*, 2006).

En parallèle des transformations tissulaires et cellulaires induites par la sénescence, un shift métabolique est mis en place afin de répondre à la transition puits/source. On assiste ainsi à une chute du contenu en NiR, GS2 et Fd-GOGAT chloroplastiques du fait de la protéolyse plastidiale, couplée à une accumulation de GS1 cytosolique et de GDH mitochondriale nécessaires à la réassimilation et au recyclage de l'azote. Une surexpression de plusieurs gènes codant pour des GS1 cytosoliques ainsi qu'une répression du gène codant pour la GS2 chloroplastique sont observées lors de la sénescence et du stress oxydatif plastidial concomitant (Guo *et al.*, 2004 ; Teixeira, 2005 ; Cabello *et al.*, 2006 ; Masclaux-Daubresse, 2008). L'induction de l'activité GS1 dans le cytosol semble être liée à celle d'une protéine kinase qui participerait à son activation, suggérant ainsi l'implication d'un processus de phosphorylation dans la régulation de la mobilisation azotée lors de la sénescence foliaire (Finnemann and Schjoerring, 2000 ; Li *et al.*, 2006).

Les cellules du mésophylle sont les premières affectées par le processus de sénescence, au sein desquelles un stockage transitoire des composés issus de la dégradation des protéines est observé dans le compartiment vacuolaire. Les tissus proches des nervures sont maintenus en activité et assurent le transport des nutriments remobilisés tout au long de la sénescence. Les aminoacides libérés par protéolyse sont généralement métabolisés en glutamate et en NH_4^+ par des réactions de transamination et de déamination. Ce glutamate peut servir à la synthèse de Gln dans les cellules mésophylliennes via une GS1 cytosolique en utilisant le NH_4^+ relâché par protéolyse/déamination, ou être transporté jusqu'aux cellules compagnes pour être exporté tel quel via le phloème ou métabolisé via une GDH pour la fourniture de 2-oxoglutarate comme substrat respiratoire ou via une GS1 pour la production de Gln. Un "switch" du site intracellulaire d'assimilation du NH_4^+ du chloroplaste vers le cytosol est donc visible durant la sénescence des cellules mésophylliennes ou les cellules compagnes (Brugière *et al.*, 2000). Par ailleurs, la Gln peut être directement exportée via le phloème ou convertit en Asn dans les cellules compagnes via une activité AS. Au cours de la sénescence, le métabolisme azoté est donc orienté vers la synthèse des aminoacides préférentiellement transportés à longue distance par le phloème (Gln, Glu, Asn et Asp), ce qui corrobore avec la co-expression dans les cellules compagnes des gènes

codant pour les GOGAT, la GS1 et l'AS (Potel *et al.*, 2009 ; Lothier *et al.*, 2011 ; Gaufichon *et al.*, 2013).

- **Régulation de la sénescence foliaire**

La sénescence foliaire fait partie intégrante du cycle de développement de la plante puisqu'elle constitue la phase finale du développement de la feuille, et apparaît donc logiquement liée à l'âge. Du fait de l'importance de ce processus dans la redistribution et l'économie de nutriments et d'énergie au sein de la plante, de nombreux facteurs environnementaux et internes influencent également sa régulation. En effet, plus de 200 gènes SAGs codant pour des FT spécifiquement exprimés durant la sénescence sont impliqués dans la régulation de ce phénomène, ce qui sous-entend l'existence d'un réseau de régulation transcriptionnelle complexe et étroitement lié aux conditions physiologiques et environnementales (He *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2012 ; Guo, 2012), d'autant plus que le phénomène de sénescence séquentielle (pendant la phase végétative) semble être contrôlé différemment de celui de sénescence monocarpique (liée à l'apparition des organes reproducteurs) (Luquez, 2006).

De nombreux facteurs environnementaux sont impliqués dans la régulation de la sénescence. Ainsi, des facteurs biotiques tels que la concentration en ozone, la lumière (photopériode, qualité et intensité du rayonnement), la disponibilité en eau et en nutriments et la température, peuvent fortement contribuer à la régulation de ce phénomène (Etienne *et al.*, 2007 ; Lim *et al.*, 2007 ; Diaz *et al.*, 2008). Parmi les facteurs de régulation endogènes, les phytohormones et leur équilibre jouent un rôle prédominant. Deux classes s'opposent puisqu'une accumulation de CKs, AIA ou de gibbérélines (GAs) tend à retarder l'entrée en sénescence, alors qu'une accumulation d'éthylène, ABA, d'acide salicylique (SA) ou de MeJA accélérerait la sénescence foliaire (van der Graaff, 2006 ; Guiboileau *et al.*, 2010). D'autres molécules telles que les brassinostéroïdes, les polyamines, le NO, les ROS et certains miRNA semblent également jouer un rôle dans l'induction ou la régulation de ce processus (van der Graaff, 2006 ; Sarwat *et al.*, 2013).

Parmi les stress nutritionnels, une limitation de la disponibilité en azote est connue pour accélérer le déclenchement et la progression de la sénescence foliaire (Gan and Amasino, 1997 ; Tilsner *et al.*, 2005 ; Gombert *et al.*, 2006 ; Etienne *et al.*, 2007 ; Diaz *et al.*, 2008 ; Agüera *et al.*, 2010). D'un point de vue physiologique, cette induction peut être perçue comme la réponse de la plante contrainte à remobiliser de façon prématurée l'azote préalablement assimilé. D'un point de vue métabolique, la faible disponibilité en azote induit un ralentissement de la synthèse d'acides aminés et donc la mise en place d'un déséquilibre du ratio C/N, l'accumulation de squelettes carbonés tels que les sucres solubles étant connue pour induire une chute de l'activité photosynthétique (Pourtau *et al.*, 2004 ; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006a ; Wingler and Roitsch, 2008 ; Wingler *et al.*, 2009). De la même façon, une carence en azote combinée à une augmentation de l'intensité lumineuse tend à accélérer la sénescence foliaire encore plus que ne le ferait la carence seule (van Doorn, 2008). L'équilibre entre le métabolisme carboné et azoté apparaît donc comme étant l'une des pierres angulaires contrôlant le processus de sénescence foliaire (Wingler, 2005 ; Agüera *et al.*, 2010 ; Guiboileau *et al.*, 2010).

Parallèlement, la nutrition soufrée joue un rôle tout aussi important chez le colza dans la régulation de la sénescence foliaire puisqu'un système de compensation basé sur la gestion fine des réserves soufrées est mis en place en réponse à une déficience temporaire en soufre. En effet, chez un plant de colza préalablement non-carencé (et ainsi muni de réserves), une déficience temporaire en soufre induit un délai de la sénescence foliaire concomitant à la préservation des capacités photosynthétiques de par le maintien d'une concentration foliaire élevée en chlorophylles et une protéolyse réduite (Dubousset *et al.*, 2009 ; Abdallah *et al.*, 2011). Ce délai de la sénescence participe à l'augmentation de l'efficacité de remobilisation du soufre (SRE), par une forte remobilisation des sulfates (SO_4^{2-}) stockés dans les vacuoles du compartiment foliaire (Blake-Kalff *et al.*, 1998 ; Dubousset *et al.*, 2009, 2010 ; Abdallah *et al.*, 2010, 2011) induite par la surexpression des gènes *BnSultr4.1* et *BnSultr4.2* codant pour des transporteurs de SO_4^{2-} (Parmar *et al.*, 2007; Dubousset *et al.*, 2009). L'induction d'un délai de la sénescence en réponse à une déficience temporaire en soufre participe également au maintien des capacités d'assimilation du soufre et de l'azote des feuilles (Abdallah *et al.*, 2010, 2011) et serait induit par une régulation différentielle de la biosynthèse de l'éthylène. En effet, le recyclage du S-adenosyl-méthionine (SAM) préexistant et l'assimilation du soufre normalement au profit de la synthèse de SAM seraient dans ce cas fortement basculés vers la synthèse de Met (Nikiforova *et al.*, 2003 ; Nikiforova, 2004, 2005), d'où une disponibilité réduite de SAM pour la synthèse d'éthylène. L'éthylène étant impliquée dans le phénomène d'abscission des feuilles sénescentes, son taux limité en conditions de limitation en soufre temporaire participerait au délai de la chute des feuilles (Dubousset *et al.*, 2009 ; Abdallah *et al.*, 2011).



Figure 38 : Recensement des parcelles infestées par l'orobanche rameuse en France (CETIOM, 2013)

3 Interaction *Brassica napus* / *Phelipanche ramosa*

Cela fait maintenant plus d'un siècle qu'on connaît la capacité de l'orobanche rameuse à infester les plantes d'intérêt agronomique. En effet, dès le milieu du XIX^{ème} siècle, plusieurs auteurs rapportent sa présence au sein de cultures de chanvre (Holandre, 1842 ; Godron, 1857), de tabac (Le Maout and Decaisne, 1876) et de tomate (Lavergne, 1893). Certains manuels détaillent les techniques utilisées à l'époque pour lutter contre ce parasite, une des plus répandues consistait à mettre en place des campagnes municipales d'arrachage. En France, l'extension de ce parasite dans la région Maine et Loire (au sens large) serait directement associée à l'importation de graines de chanvre en provenance de Turquie, entre 1920 et 1939 (Nicot, 1959). Depuis quelques décennies, on suppose le danger potentiel que cet holoparasite représente pour la culture du colza en Europe, l'orobanche rameuse étant susceptible de se fixer sur plusieurs espèces de la famille de *Brassicaceae*. Ainsi, dès le milieu des années 80, la recherche de sources de résistance chez le colza a débuté en Espagne dans l'optique d'anticiper l'expansion de cette culture au sein de territoires potentiellement infestés (Sobrino-Vesperinas, 1985).

3.1. Situation française et européenne

Malgré cette forme d'anticipation, le développement de la culture du colza en France s'est accompagné dans certaines régions d'une remarquable adaptation de l'orobanche rameuse à ce type d'agrosystème. Depuis maintenant une quinzaine d'années, *Phelipanche ramosa* est devenue réellement problématique pour la culture du colza, dans les régions les plus touchées. L'épicentre de l'infestation se trouve dans la région Poitou-Charentes - Vendée, mais de nouvelles parcelles sont détectées régulièrement dans le Nord-Est (Aube), et plus ponctuellement dans le Sud-Ouest et le Sud-Est (**Fig. 38**). Le CETIOM (Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux et du Chanvre), en collaboration avec les chambres d'Agriculture des Deux-Sèvres, de la Vendée, de la Charente et de l'Aube ainsi que l'ANITTA (Institut du Tabac), organise la surveillance vis-à-vis de *P. ramosa* par le biais d'une enquête en ligne (<http://www.cetiom.fr/orobanche/>) permettant aux agriculteurs concernés par cette problématique d'apporter leurs observations (niveau d'infestation, variété(s) hôte(s)...). En 2008, ils estimaient que près de 10 % de la sole de colza française était infestée par l'orobanche rameuse. L'expansion de ce parasite semble malheureusement vouée à se poursuivre. En effet, il n'existe à l'heure actuelle, aucune variété de colza totalement résistante, ni de moyen de lutte durable et efficace.

Récemment, des compagnies semencières ont également fait état de sérieux cas d'infestations de cultures de colza par *P. ramosa* dans d'autres pays d'Europe (Bulgarie et Grèce principalement) concomitant au développement de cette culture oléagineuse au sein de pays n'ayant pas encore mis en place de méthodes de contrôle permettant de freiner l'expansion du parasite (Shindrova and Kostov, 2009; Tsialtas and Eleftherohorinos, 2011).

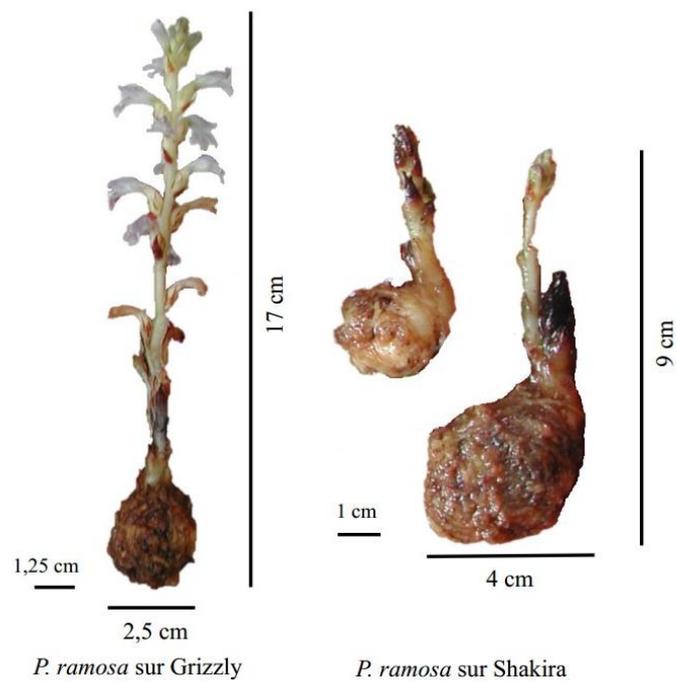


Figure 39 : Différences morphologiques observées entre les tubercules de *P. ramosa* fixés sur le génotype Grizzly (phénotype normal) et Shakira (phénotype perturbé : gros tubercule, tige grêle) (Gauthier, 2012)

- **Programme de recherche "Résistances"**

Bien qu'aucune résistance totale à l'orobanche rameuse n'ait été observée jusqu'à maintenant chez le colza (Zehhar *et al.*, 2003), Gauthier et associés ont pu démontrer l'existence de trois composantes de résistance partielle par le biais d'un screening de génotypes commerciaux (lignées) aux comportements contrastés face à l'orobanche (Gauthier *et al.*, 2012b). Si on considère la chronologie de l'interaction, la première source de résistance provient de la capacité de certains génotypes à induire faiblement la germination des graines de *P. ramosa*. Ce mécanisme d'évitement repose sur une faible exsudation racinaire de stimulants de germination ou au contraire sur une exsudation accrue d'inhibiteurs de germination chez ces génotypes. Ce mécanisme montre toutefois ses limites lors de fortes infestations. Ensuite, certains génotypes montrent une capacité à limiter le nombre de fixations d'orobanches sur leurs racines indépendamment de leur capacité à induire la germination du parasite, les mécanismes sous-jacents restant pour l'instant inconnus. Enfin, certaines accessions de colza perturbent le développement du parasite une fois fixé (retard de croissance, changements morphologiques, **Fig. 39** ; limitation de l'émergence). Ce phénomène suggère l'induction tardive par le colza d'une dérégulation hormonale chez le parasite (Péron, 2010).

- **Variabilité génétique de l'orobanche rameuse**

L'homogénéité phénotypique du genre *Orobanche* a toujours complexifié la distinction des différentes espèces, qui de plus peuvent montrer quelques légères variations suivant les hôtes ou la région du globe. En France, la forte polyphagie de l'orobanche rameuse et sa récente adaptation au colza d'hiver ont ouvert la voie à de nombreux questionnements concernant la notion de population ou d'espèce chez cet holoparasite. Des travaux récents menés au laboratoire et basés sur l'utilisation de marqueurs intergénomiques mitochondriaux et plastidiaux couplés à des marqueurs microsatellites ont permis de dissocier trois types génétiques, dont l'un est clairement responsable des dommages occasionnés sur les cultures de colza dans l'Ouest de la France (Benharrat *et al.*, 2005 ; Voisin *et al.*, 2011). L'orobanche rameuse semble en effet capable de s'adapter à une plante hôte (stimulants, durée du cycle de vie...), les graines issues de population et donc d'hôtes différents présentant une nette spécificité (augmentation de l'agressivité et adaptabilité accrue au cycle ontogénétique) envers cet hôte comparé à d'autres plantes hôtes sensibles (Benharrat *et al.*, 2005 ; Gibot-Leclerc *et al.*, 2013). Cependant, l'espèce hôte n'est pas le seul paramètre contribuant à expliquer la variabilité génétique de *P. ramosa*, puisqu'une nette discrimination apparaît lorsqu'on considère la localisation géographique des trois populations (celle de l'Ouest étant bien distincte des autres). D'une part, l'absence d'hétérozygotie et la faible diversité génétique observées au sein des différentes populations (Voisin *et al.*, 2011) peuvent être imputables au mode de reproduction majoritairement autogame de cette espèce (Brault *et al.*, 2007) ou à un effet fondateur, qui promeuvent la fixation de mutations et la différenciation génétique de populations. D'autre part, l'intensification de la culture du colza dans l'Ouest de la France à la fin des années 80 a pu promouvoir l'introduction accidentelle d'un nouveau génotype d'orobanche au sein d'un environnement pédoclimatique qui lui était favorable.

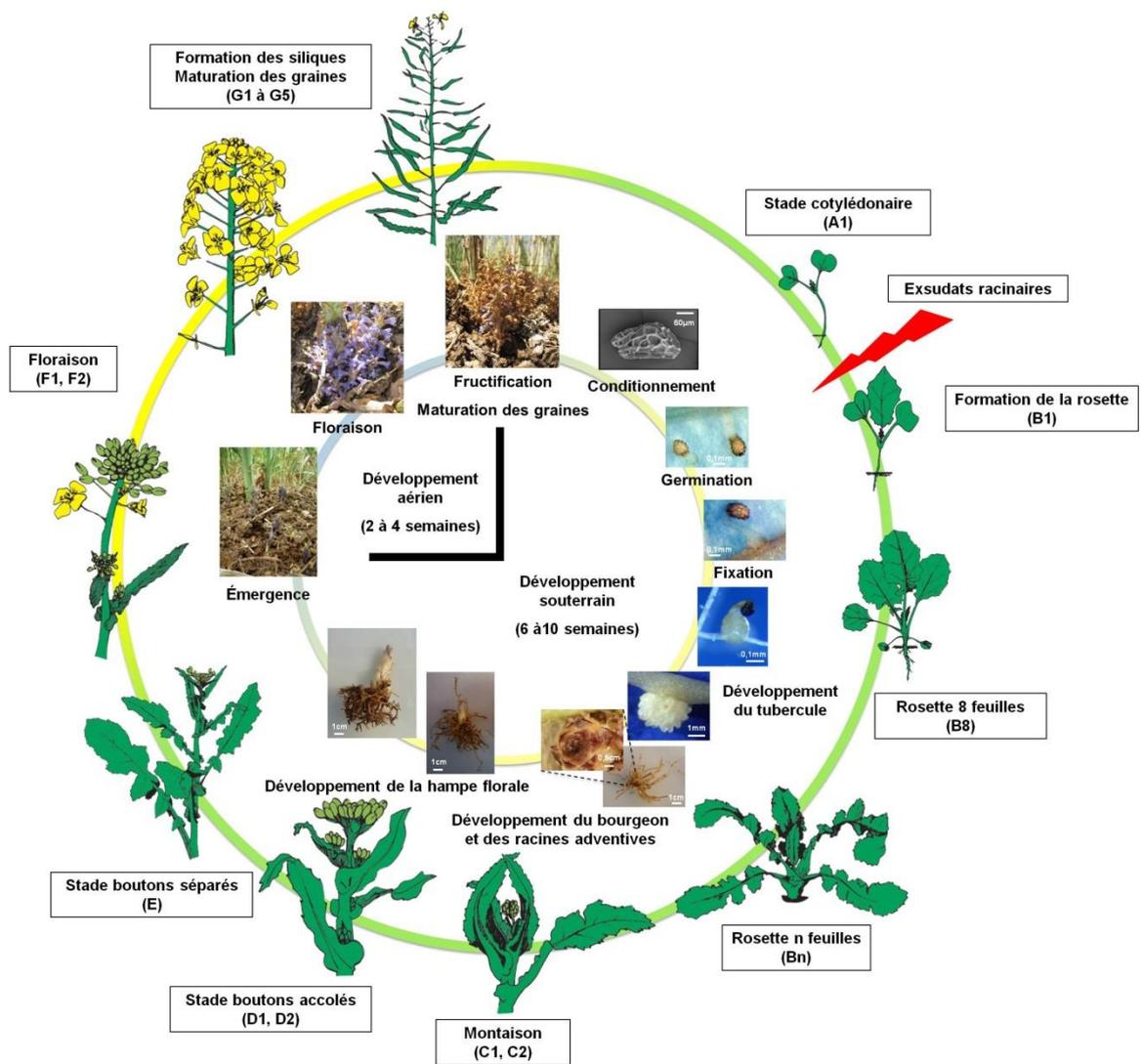


Figure 40 : Cycle biologique de l'orobanche rameuse hautement synchronisé à celui du colza

3.2. Description de l'interaction *Phelipanche ramosa* / *Brassica napus*

- **Cycle biologique**

Cette interaction ne déroge pas à la règle puisque le cycle de l'orobanche rameuse présente une forte synchronisation avec celui du colza (**Fig. 40**). Gibot-Leclerc et collaborateurs ont publié une étude fine du cycle biologique de cette interaction qui pourra donc servir de point de départ à toute comparaison (Gibot-Leclerc *et al.*, 2012). Ce suivi a été réalisé au sein d'une parcelle de Charente-Maritime ensemencée avec le génotype de colza Zénith, en comparaison d'expérimentations *in vitro* donnant des résultats chronologiquement similaires.

Dans ces conditions, le colza présente une capacité d'induction de la germination maximale seulement 21 jours après émergence (JAE ; stade B6), les jeunes tubercules d'orobanche étant visibles environ un mois après émergence (stade B8) sur les racines latérales du colza. Environ 50 JAE (stade B12), un bourgeon se forme sur les tubercules ainsi qu'un certain nombre de racines adventives qui peuvent, le cas échéant, former des haustoria secondaires sur des racines hôtes avoisinantes. A ce stade du développement, le méristème caulinaire de l'orobanche reste protégé par des écailles à l'intérieur du bourgeon. Les auteurs insistent ici sur le fait que tous les tubercules fixés sont approximativement au même stade et que seul de rares nouvelles fixations d'orobanche sont observées. Ensuite, alors que le colza atteint le stade rosette (70 JAE), les tubercules d'orobanche développent de façon synchronisée de jeunes tiges souterraines à partir du méristème caulinaire. C'est sous cette forme et sous la forme de tubercules que l'orobanche passe la période hivernale fixée au système racinaire de l'hôte.

A la reprise de végétation (stade C1), les auteurs insistent à nouveau sur le fait qu'aucune nouvelle fixation ou jeune tubercule n'est observé. Les tiges souterraines des orobanches croissent jusqu'au stade E (boutons séparés) du colza. L'émergence du parasite a lieu lorsque le colza entre en floraison (stade F1, 205 JAE). Les hampes d'orobanches ne commencent à fleurir qu'au moment où le colza débute sa fructification (stade G1-G2, 244 JAE). *P. ramosa* entre alors en fructification lors de la phase de remplissage des graines du colza (stade G4, 273 JAE), les graines du parasite (600 à 800 par capsule) arrivant à maturité quelques jours après celles du colza. Ce léger décalage de maturation n'est en rien problématique pour le parasite puisque la récolte du colza laisse en place les hampes florales (barre de coupe plus haute), remarquablement alignées aux rangs semés. Toute intervention agricole postérieure participera donc à l'enfouissement ou à la propagation du stock grainier du parasite.

Les travaux de Gibot-Leclerc *et al.* (2012) relate au final un scénario d'infestation relativement simple avec une seule vague d'infestation précoce en automne. Nos propres observations (chapitre 2 des résultats) montrent que la situation au champ peut être plus complexe, avec la possibilité d'une seconde vague d'infestation du colza au cours du printemps suivant. Ainsi, le colza présente, selon les conditions climatiques printanières et la variété, plusieurs périodes de sensibilité à l'orobanche au cours de la culture. De même, il semble que les conditions climatiques hivernales (humidité, température) conditionnent la survie des tubercules dans le sol au cours de cette période.

- **Impact sur la plante hôte**

Toujours d'après Gibot-Leclerc et associés (2012), les symptômes de l'infestation restent invisibles durant la phase automnale et hivernale, pour la variété Zénith. Sur cette période, le seul moyen d'identifier avec précision la présence d'orobanche sur une parcelle reste l'arrachage et l'examen fin du système racinaire. A la reprise de végétation printanière, les premiers symptômes visibles apparaissent (nanisme, zones de dépression, chlorose foliaire) et deviennent de plus en plus marqués lors de l'émergence du parasite, chaque pied de colza pouvant arborer 15 à 20 hampes florales parasites lors de sévères infestations. La périphérie des parcelles semble plus touchée. L'infestation provoque enfin une diminution conséquente du nombre de siliques, dont une bonne partie avorte. Le rendement de la culture en est alors fortement impacté puisque dans ces conditions de forte infestation il passe de 38 q ha⁻¹ à 4 q ha⁻¹ (90 % de perte). L'impact du parasite semble être globalement explicable par une dérégulation forte de l'équilibre sources/puits, l'orobanche devenant rapidement le puits majoritaire prévalant sur les organes végétatifs et reproducteurs nouvellement formés de la variété de colza Zénith. Enfin Gibot-Leclerc et associés posent l'hypothèse qu'une dérégulation de la balance hormonale pourrait également être à l'œuvre chez le colza, puisqu'une diminution de la quantité de GAs et de CKs corrélée à une accumulation d'ABA pourrait expliquer en partie le délai de croissance et le nanisme observé à la reprise de végétation.

Nos propres observations au champ viennent compléter celles de Gibot-Leclerc *et al.* (2012). La précocité des symptômes sur les variétés non-tolérantes dépend fortement des conditions climatiques au cours de la culture. En effet, une forte pression parasitaire dès l'automne en conséquence de conditions climatiques, de septembre à décembre, propices au développement de l'orobanche (moyennes de température élevées, faible pluviosité) peut être très dommageable au développement automnal du colza, créant ainsi des zones de dépression nettement visibles dès l'automne ou en sortie d'hiver. Au contraire, des moyennes de température basses en plus d'une forte pluviométrie en automne et en hiver tendent à réduire la pression parasitaire au cours de la reprise de végétation printanière, et retardent ainsi l'apparition des symptômes dans les parcelles. De plus, un printemps froid et humide, certes peu clément au développement du colza (retard de floraison), se révèle peu propice à une seconde vague d'infestation qui est alors très tardive au cours de cette période. Dans ces conditions, l'impact de l'infestation sur le rendement des cultures est extrêmement réduit. Néanmoins, les professionnels de la filière (agriculteurs, semenciers et centres techniques) s'accordent sur le constat d'une forte variabilité, d'une année à l'autre, des niveaux d'infestation et de l'impact sur les cultures, que les différences variétales et climatiques ne suffisent pas à expliquer.

3.3. Particularité de l'interaction *Phelipanche ramosa* / *Brassica napus*

Bien que le cycle biologique de l'orobanche rameuse fixée au colza soit relativement similaire à celui observé sur d'autres plantes hôtes (hormis la durée), un point particulier reflète la spécificité de cette interaction et l'adaptabilité de cet holoparasite. Auger et associés ont démontré que le stimulant principal de la germination des graines d'orobanche exsudé par le

système racinaire du colza, voire également d'autres *Brassicaceae*, est un isothiocyanate (ITC), issu de la dégradation de GLS (Auger *et al.*, 2012). Plus précisément, le stimulant identifié chez le colza est le 2-PEITC (pour 2-phényléthyl isothiocyanate) issu de la dégradation de la gluconasturtiine (2-phényléthyl glucosinolate), le GLS le plus abondant des racines de colza (Kirkegaard and Sarwar, 1998). Cet ITC, identifié au champ comme le seul présent en concentration suffisante dans la rhizosphère du colza pour stimuler la germination des graines du parasite (Rumberger and Marschner, 2003), présente un certain nombre d'avantages comparé aux produits de dégradation d'autres GLS, puisqu'il se révèle être l'un des ITCs les moins volatils, l'un des plus hydrophobes et l'un des plus lipophiles de part la présence du groupement phényl. Ces caractéristiques favorisent aussi bien sa stabilité et sa rétention dans le sol, que sa perméabilité membranaire envers les autres organismes de la rhizosphère (nécessaire puisqu'il s'agit d'une molécule de défense ; van Dam *et al.*, 2008). Les plus fortes concentrations de GLS localisée sous l'épiderme des racines de colza (McCully *et al.*, 2008) corrobore par ailleurs avec leur exsudation potentielle dans la rhizosphère. De plus, l'enzyme responsable de leur dégradation, la myrosinase (EC 3.2.3.1), est confinée dans des idioblastes de tissus internes de la racine (Andreasson *et al.*, 2001 ; McCully *et al.*, 2008). Ces différences de localisation entre les GLS et la myrosinase s'opposent à une production d'ITC dans des racines saines et sous-entendent que la dégradation des GLS est effectuée dans la rhizosphère, par le biais de myrosinase exsudée par des racines blessées ou déchirées ou par des microorganismes du sol. Ces résultats soutiennent l'hypothèse d'une implication significative d'un troisième partenaire dans l'interaction, provenant de la microfaune du sol. La microbiologie des sols semble ainsi un paramètre majeur à considérer dans l'établissement de l'interaction colza - orobanche.

À notre connaissance, aucune autre espèce d'orobanches n'est sensible aux ITC, ce qui en fait l'un des traits adaptatifs caractéristiques de cette interaction et qui pourrait en partie expliquer l'adaptation relativement récente de l'orobanche rameuse aux cultures de colza de l'Ouest de la France. La pression de sélection imposée au parasite par de nouvelles plantes hôtes pourraient donc être un des moteurs principaux de l'émergence de nouvelles populations chez *P. ramosa*, comme observé pour d'autres plantes parasites (de Vega *et al.*, 2008 ; Thorogood *et al.*, 2009 ; Joel *et al.*, 2011).

Bien que le stimulant de germination identifié (en concentration physiologique) dans la rhizosphère du colza soit un ITC, les travaux d'Auger et collaborateurs (2012) n'avaient pas exclu l'hypothèse d'une exsudation, alors extrêmement réduite, de SLs par cette *Brassicaceae*. En effet, préalablement à cette étude, l'orobanchol avait été identifié dans la rhizosphère d'*A. thaliana* (Goldwasser *et al.*, 2008). Depuis, l'équipe du Professeur K. Yoneyama a réussi à démontrer la présence de plusieurs SLs, notamment l'orobanchyl acétate, en très faible quantité dans les exsudats racinaires concentrés du colza cultivé en conditions favorables à l'exsudation de SLs (carence phosphatée, K. Yoneyama : communication personnelle). Ces résultats ne sont pas pour autant surprenants face au rôle ubiquitaire des SLs en tant qu'hormones impliquées dans le contrôle du développement des plantes (Gomez-Roldan *et al.*, 2008 ; Umehara *et al.*, 2008 ; Crawford *et al.*, 2010 ; Koltai, 2011 ; Brewer *et al.*, 2012 ; Dun *et al.*, 2012 ; Foo *et al.*, 2013 ; Marzec *et al.*, 2013). À la lumière de ces résultats, il reste à définir les conditions environnementales, culturelles et biologiques qui, en influant sur le ratio de concentrations

ITCs/SLs de la rhizosphère, pourraient contrôler le degré d'implication des SLs (ou des ITCs) dans la mise en place de cette interaction.

Objectifs et stratégies de recherche

Le colza d'hiver (*Brassica napus* L.) se caractérise en partie par sa faible efficacité d'utilisation de l'azote, résultant d'une capacité limitée à remobiliser l'azote organique foliaire, notamment durant la phase de développement végétatif. En effet, une forte proportion de l'azote absorbé reste immobilisée dans les feuilles sénescentes lors de leur chute, à défaut de contribuer plus tard à l'élaboration du rendement en graines. De ce fait, la productivité de la culture du colza d'hiver est fortement dépendante de la fertilisation azotée. Cependant, les directives actuelles de diminution du coût énergétique et de l'impact environnemental des cultures encouragent vivement à reconsidérer les itinéraires culturaux jusqu'alors usités en réduisant l'usage des intrants (phytosanitaires et fertilisants). Dans cette optique, la sélection variétale s'est axée depuis quelques années sur l'amélioration des caractères intrinsèques liés à une efficacité renforcée d'utilisation de l'azote fourni. Or, l'adaptation récente d'une adventice parasite, l'orobanche rameuse (*Phelipanche ramosa* (L.) Pomel) à ce type d'agrosystème, ouvre la porte à une large réflexion sur l'incidence du parasitisme sur l'efficacité d'utilisation de l'azote du colza et sur l'impact d'une réduction des intrants azotés sur la sensibilité du colza à l'orobanche.

Ainsi ces travaux de thèse se sont construits à partir de cette réflexion, et se sont par conséquent attachés à appréhender l'impact de la fertilisation sur la mise en place de cette interaction plante - plante parasite, et à caractériser le corollaire de l'addition du puits surnuméraire que représente le parasite sur le schéma d'utilisation de l'azote du colza. La connaissance approfondie des traits physiologiques et métaboliques de la nutrition azotée de l'orobanche mais également de l'impact de ce parasite sur le métabolisme azoté du colza devrait faciliter la mise en place de stratégies innovantes de lutte contre cette adventice ou de sélection de variétés résistantes/tolérantes à l'orobanche. La poursuite de ces objectifs a donné lieu à un découpage du travail de thèse en trois chapitres.

Chapitre 1. Impact de la fertilisation azotée, soufrée et phosphatée sur la sensibilité de *B. napus* à *P. ramosa*

Aux regards de l'importance de la fertilisation azotée et soufrée pour la culture de colza, des interrelations entre l'azote et le soufre, et de l'impact du phosphate sur l'exsudation racinaire de stimulants de germination des graines d'orobanche, l'objectif de cette première partie des travaux de thèse a été de caractériser l'impact de carences en azote, en soufre, en azote/soufre et en phosphate sur deux étapes clés de la mise en place de l'interaction colza - orobanche rameuse que sont l'induction de la germination des graines de plante parasite par l'exsudation racinaire de molécules stimulantes et la fixation de la très jeune plante parasite au système racinaire de l'hôte nécessaire au développement d'un tubercule végétatif.

Deux approches bien distinctes ont été développées afin de poursuivre ces objectifs. Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la capacité du colza à produire ou exsuder le 2-PEITC, issu de la dégradation de la gluconasturtine et caractérisé comme le stimulant majoritaire de la rhizosphère du colza, mais aussi de potentielles SLs. Pour ce faire, une méthode de mesure haut-débit de la germination des graines d'orobanche a été mise au point de façon à évaluer la capacité de stimulation d'un grand nombre d'exsudats racinaires concentrés de colza cultivés en hydroponie en réponse à des variations de fertilisation. Parallèlement, une méthode

de co-culture en mini-rhizotron a été adaptée à l'étude de l'impact de différents régimes de fertilisation, d'une part, sur la capacité des plants de colza à induire la germination des graines du parasite et d'autre part, sur la capacité de ce dernier à se fixer sur le système racinaire de l'hôte.

La méthode de mesure haut-débit de la germination des graines d'orobanche développée pour cette étude est présentée ici sous forme d'un article très récemment publié dans *Plant Methods* (Pouvreau J.B., Gaudin Z. et al. 2013). Un second article regroupant les principaux résultats acquis dans ce chapitre, en collaboration avec Kaori et Koichi Yoneyama (Yoneyama Laboratory, Weed Science Center, Utsunomiya University) est également en préparation.

Chapitre 2. Absorption, translocation et flux d'azote dans l'interaction *B. napus* / *P. ramosa*

L'ambition de cette seconde partie a été de s'intéresser spécifiquement aux flux d'azote globaux entre l'hôte et le parasite après établissement des connexions vasculaires interspécifiques. L'objectif de ce chapitre fut d'évaluer l'impact de l'orobanche sur le schéma d'utilisation de l'azote du colza mais également de caractériser le puits surnuméraire que représente le parasite vis-à-vis des flux d'azote globaux de l'interaction.

Les expérimentations ont été conduites en serre en conditions de nutrition azotée et d'alimentation hydrique constantes, sur deux génotypes de colza (ES Alienor et Shakira) présentant des comportements contrastés face à l'orobanche. Les colzas ont également subi une période de vernalisation nécessaire à la réalisation de leur cycle ontogénétique complet, afin d'adapter au maximum les conditions expérimentales à celles rencontrées au champ. La caractérisation des flux d'azote a été réalisée par le biais d'une approche de traçage isotopique ¹⁵N.

Les résultats présentés dans ce chapitre feront également l'objet d'une publication actuellement en cours de préparation.

Chapitre 3. Caractérisation métabolomique de l'interaction *B. napus* / *P. ramosa*

En prolongement de la seconde partie, ce dernier chapitre de thèse s'est attaché au profilage qualitatif et quantitatif des principaux métabolites azotés (aminoacides) et carbonés (glucides, polyols et acides organiques) accumulés dans les différents compartiments de l'interaction et transférés de l'hôte vers le parasite. L'objectif de ce chapitre fut d'évaluer l'impact de l'infestation sur les pools d'aminoacides libres des différents organes du colza, mais également de mettre en lumière les particularités métaboliques de l'interaction, et plus spécifiquement des composés transférés de l'hôte vers le parasite. Nous nous sommes également intéressés, chez l'orobanche, au métabolisme des principales formes azotées prélevées chez le colza.

Pour cela, la démarche a consisté d'une part, à proposer une technique simplifiée d'apport de composés azotés (marqués au ^{15}N) mimant l'apport phloémien entre l'hôte et le parasite, et d'autre part de développer une méthode d'analyse des isotopologues ^{15}N d'acides aminés appropriée pour le suivi de leur transfert des racines de colza vers les tubercules d'orobanche et de leur utilisation par le parasite.

Les résultats obtenus dans ce dernier chapitre ont fait l'objet d'un article sur le point d'être soumis dans *Analytical Chemistry*. Dans ce chapitre, des résultats supplémentaires viennent compléter la présentation de cet article, de façon à ouvrir la discussion et avancer les perspectives qui découlent de ces travaux.

**Chapitre 1 Impact de la fertilisation azotée,
soufrée et phosphatée sur la sensibilité de
Brassica napus à *Phelipanche ramosa***

1 Matériels et méthodes

1.1 Matériel végétal

- ***Phelipanche ramosa* (L.) Pomel**

Les graines d'orobanche rameuse sont issues de hampes florales matures collectées en 2005 sur la commune de Saint Martin de Fraigneau (Vendée, France), au sein de parcelles de colza d'hiver naturellement infestées. Elles ont été conservées à l'obscurité à 25 °C.

- ***Brassica napus* L.**

Le génotype de colza Expert (variété double zéro) a été choisi dans ces travaux pour sa sensibilité à l'orobanche rameuse (Gauthier *et al.*, 2012b) et son bon comportement dans nos conditions de culture en mini-rhizotron. Les graines ont été gracieusement fournies par la SARL Adrien Momont & Fils (Mons-en-Pévèle, France).

- **Stérilisation des graines**

La stérilisation des graines d'orobanche et de colza est effectuée, sous agitation vigoureuse, par immersion de 5 min dans une solution d'hypochlorite de sodium (3,61 %), suivie de 3 rinçages brefs (30 s) puis de 3 rinçages longs (5 min) à l'eau distillée stérile. La stérilisation des graines de colza peut nécessiter l'ajout de 0,01 % à 0,1 % de Tween 20 dans l'eau de Javel afin de perméabiliser plus intensément leur tégument.

- **Conditionnement des graines d'orobanche *in vitro***

Suite à la stérilisation, les graines d'orobanche subissent une période de conditionnement d'au minimum 4 jours à l'obscurité à 21 °C (Gibot-Leclerc *et al.*, 2004 ; Lechat *et al.*, 2012). Les graines stérilisées sont suspendues dans une solution tampon Na, K (1 mmol L⁻¹, pH = 7,5), puis déposées dans une flasque de culture cellulaire de 50 mL avec bouchon à membrane filtrante (≈ 150 mg de graines dans 6 mL) ou directement distribuées en plaques 96 puits à fond plat (≈ 150 mg dans 15 mL puis 50 µL ≈ 125 graines par puits) par la suite scellées au parafilm.

Tableau 1.1 : Milieu de culture Tadano-Tanaka (TT) dilué au demi (pH = 6, NaOH 1mM) (Tadano and Tanaka, 1980)

Macroéléments	Concentration (mM)	Microéléments	Concentration (μM)
NH₄NO₃	1,43	MnSO₄/H₂O	20,00
NaNO₃	1,00	H₃BO₃	50,00
NaH₂PO₄	0,16	ZnSO₄/7H₂O	3,00
K₂SO₄	1,00	CuSO₄/5H₂O	0,20
CaCl₂	1,00	(NH₄)₆Mo₇O₂₄/4H₂O	0,05
MgSO₄/H₂O	1,00	FeSO₄/7H₂O	40,00
MES	1,00		

Tableau 1.2 : Modifications des macroéléments du milieu de culture TT appliquées pour les différents régimes de fertilisation

Macroéléments	Concentration (mM)				Macroéléments	N & S 0 %	Macroéléments	S 0 %
	TT	P 1000 %	P 0 %	N 0 %				
NH₄NO₃	1,43	1,43	1,43				NH₄NO₃	0,93
NaNO₃	1,00	1,00	1,00				KNO₃	2,00
NaH₂PO₄	0,16	1,60		0,16	NaH₂PO₄	0,16	NaH₂PO₄	0,16
K₂SO₄	1,00	1,00	1,00	1,00	K₂CO₃	1,00		
CaCl₂	1,00	1,00	1,00	1,00	CaCl₂	1,00	CaCl₂	1,00
MgSO₄/H₂O	1,00	1,00	1,00	1,00	MgCl₂/6H₂O	1,00	MgCl₂/6H₂O	1,00

- **Germination des graines de colza *in vitro***

Suite à la stérilisation, les graines de colza sont déposées en ligne sur un filtre en fibre de verre (Macherey-Nagel 85/90, Ø 125 mm) imbibé d'eau distillée stérile, dans une boîte de Pétri (Ø 150 mm). La moitié d'un second filtre est alors déposée sur les graines (ombrage) avant de sceller au parafilm la boîte de Petri. Les boîtes sont ensuite disposées à la verticale en chambre de culture (21 °C - 15 °C jour/nuit, héméropériode de 16h, PAR 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Cette étape permet de sélectionner les plantules les plus "vivaces" au bout de 7 jours.

1.2 Conditions de culture

- **Culture hydroponique du colza**

Les jeunes plants de colza sont transférées au bout de 7 jours dans de petits carrés de mousse déposés au fond d'une passoire, elle-même placée dans une cuvette contenant le milieu de culture (TT Medium dilué au demi, **Tab. 1.1**). Le milieu de culture est remplacé 3 fois par semaine tout au long de l'expérimentation. Les différentes privations (NO %, PO % et SO %, **Tab. 1.2**) sont appliquées après une semaine de fertilisation standard. La collecte des exsudats racinaires débute 2 jours après l'application des différents régimes de fertilisation et est effectuée pendant 3 semaines (**Fig. 1.1**). Les exsudats racinaires sont obtenus par absorption sur charbon actif à 1, 2 et 3 semaines sous les différents régimes de fertilisation, puis une étape d'extraction dans l'acétate d'éthyle permet d'obtenir un extrait concentré d'exsudats racinaires. Les colzas sont récoltés, séchés et pesés au bout de 3 semaines (plus 2 jours) sous les différents régimes de fertilisation. Cette partie de l'expérimentation a fait l'objet d'une collaboration avec le Weed Science Center (Utsunomiya University, Japon; programme bilatéral franco-japonais). La technique d'obtention des exsudats et d'extraction est donc détaillée dans les publications du laboratoire partenaire (Yoneyama *et al.*, 2007b,a).

- **Co-culture de l'association colza - orobanche rameuse en mini-rhizotron**

Les jeunes plants de colza sont transférés au bout de 7 jours en boîte de Pétri carrée (120 x 120 mm, Nunc Lab-Tek™), préalablement percée dans leur partie haute de façon à permettre le passage de la partie aérienne de la plante (**Fig. 1.2**). Le système racinaire du jeune plant est déposé délicatement sur un filtre en fibre de verre stérile (120 x 120 mm, Macherey-Nagel) recouvrant une couche de laine de roche préalablement imbibée avec du milieu de culture. Chaque boîte compte 5 plantes réparties de façon homogène. L'infestation est réalisée lorsque toutes les plantes ont été déposées. Pour cela \approx 150 mg de graines préalablement stérilisées et conditionnées en flasque de culture cellulaire sont suspendues dans 37,5 mL de tampon Na, K (1 mmol.L⁻¹, pH = 7,5), puis 4 mL (\approx 16 mg de graines) de cette solution homogénéisée par agitation légère sont distribués harmonieusement sur l'ensemble du filtre sur lequel reposent les racines des plantes. Les faces latérales et inférieure de la boîte sont ensuite scellées au parafilm, puis ces mini-rhizotrons sont recouverts de papier aluminium (maintien du

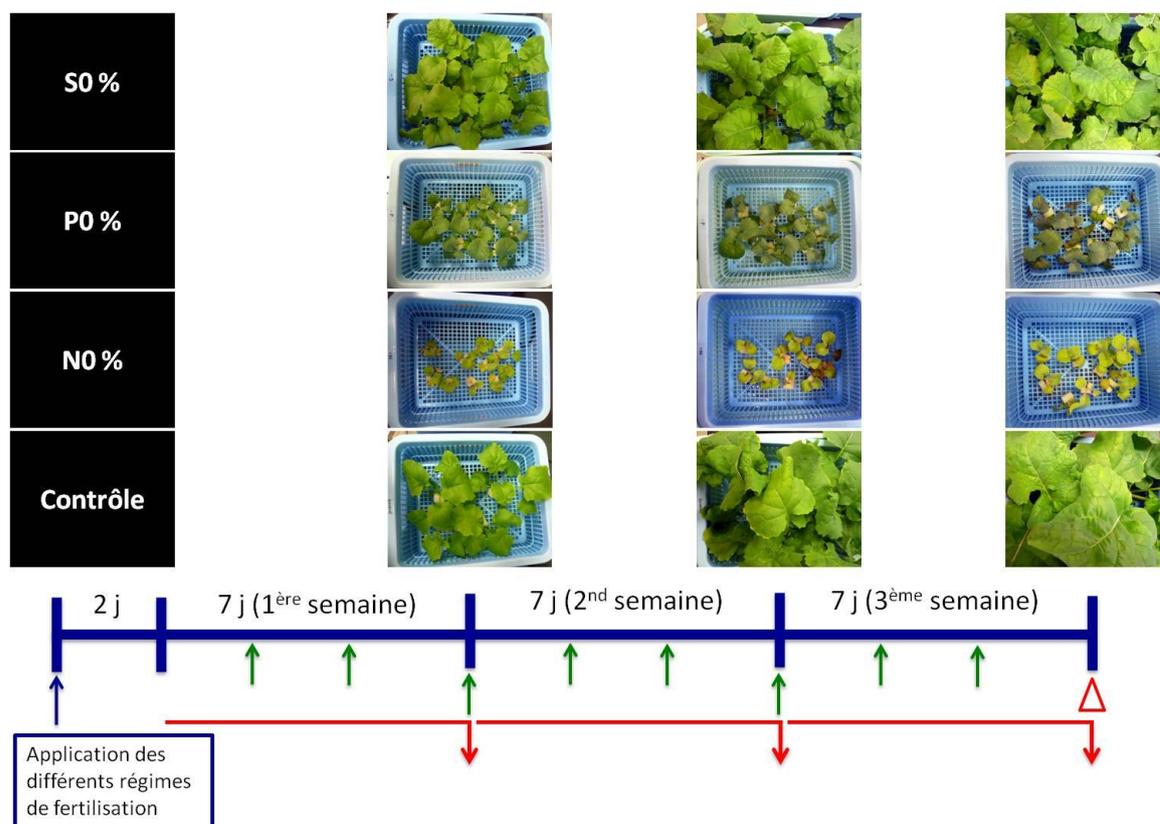


Figure 1.1 : Culture du colza en hydroponie

↑ renouvellement du milieu de culture et du charbon actif, ↓ extraction des cartouches de charbon actif cumulées, △ collecte des colzas.

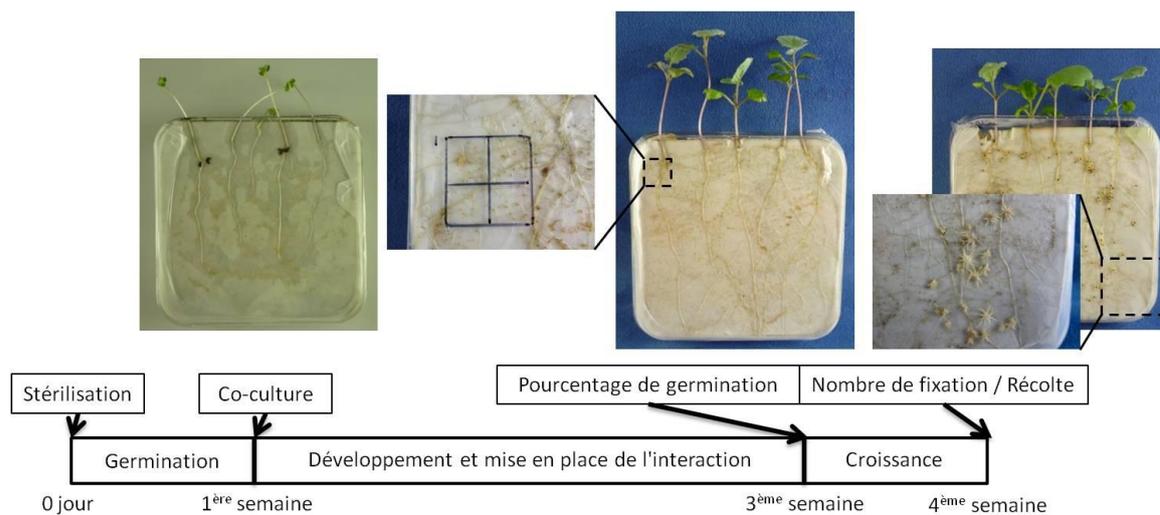


Figure 1.2 : Co-culture de l'association colza – orobanche rameuse en mini-rhizotron

système racinaire à l'obscurité), avant d'être disposés verticalement dans des bacs en chambre de culture (21 °C - 15 °C jour/nuit, héméropériode de 16h, PAR 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, HR 70 %). L'apport de milieu nutritif est effectué 3 fois par semaine (10 mL par boîte) par le dessus du mini-rhizotron. Les différents régimes de fertilisation (**Tab. 1.2**) sont appliqués dès l'inoculation.

- **Phénotypage de l'interaction**

Au sein des systèmes de co-culture, le pourcentage de germination des graines d'orobanche aux abords des racines de l'hôte est déterminé 3 semaines après l'inoculation (**Fig. 1.2**). Il est réalisé par comptage du nombre total de graines et du nombre de graines germées au sein de 4 quadrats (2 x 2 cm) disposés de façon homogène sur l'ensemble de la boîte. Le nombre d'orobanches fixées est dénombré 4 semaines après inoculation. Les différents compartiments de l'interaction (tubercules d'orobanches, système racinaire et système aérien de l'hôte) sont alors collectés, puis congelés dans l'azote liquide avant d'être lyophilisés et pesés avant analyses.

1.3 Analyses biochimiques

- **Analyses élémentaires et analyses des glucosinolates**

La composition en carbone, azote et soufre des systèmes racinaires et des parties aériennes de colza est déterminée par analyse élémentaire (Flash 2000 Series CHNS/O Analyzers, Thermo-Scientific, Waltham MA, USA; Laboratoire CEISAM de l'Université de Nantes).

L'analyse de la composition en glucosinolates (GLS) des différents échantillons de colza et d'orobanche est effectuée par UPLC-ESI-MS/MS (UPLC Acquity couplée à un détecteur quadropôles en tandem TQD muni d'une source ZsprayTM, Waters Corporation, Milford MA, USA; plateforme P₂M₂ de l'INRA du Rheu). La détection des ions non-fragmentés est réalisée en mode SIR, et leur quantification est effectuée à l'aide de courbes de calibration externes en faisant référence au signal du standard interne (la glucotropaeoline) et au poids de l'échantillon sec (expression des données en $\mu\text{mol g}^{-1}$ de matière sèche).

Ces deux types d'analyses sont réalisés sur les plants de colza infestés cultivés en système mini-rhizotron, 4 semaines après inoculation.

- **Analyse des produits de dégradation des glucosinolates**

Les extraits secs d'exsudats racinaires sont repris dans 200 μL d'hexane anhydre. Cinq μL de standard d'injection (phénanthrène 50 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) sont ajoutés par vial, puis évaporés avant l'ajout de 100 μL d'extrait. Les produits de dégradation des GLS sont séparés et analysés par chromatographie gazeuse équipée d'une colonne DB-5ms (30 m x 250 μm , 0,25 μm ; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) couplée à un spectromètre de masse (5973 mass-selective detector, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA; LABERCA, ONIRIS, Nantes). L'hélium à pression

Tableau 1.3 : Gradient de fractionnement RP-HPLC(Solvant A : H₂O + 0,1 % CH₃COOH ; Solvant B : ACN + 0,1 % CH₃COOH)

Temps (min)	Solvant A	Solvant B	Courbe
0	40	60	
5	40	60	Linéaire
15	0	100	Linéaire
20	0	100	Linéaire
22	40	60	Linéaire
30	40	60	Linéaire

Tableau 1.4 : Fractions obtenues par RP-HPLC

Temps	N° fraction
0 - 1,5	1
1,5 - 3	2
3 - 4	3
4 - 5	4
5 - 6	5
6 - 7	6
7 - 8	7
8 - 9	8
9 - 10	9
10 - 11	10
11 - 12	11
12 - 13	12
13 - 14	13
14 - 15	14
15 - 16	15
16 - 17	16
17 - 18,5	17
18,5 - 20	18
20 - 21,5	19
21,5 - 23	20
23 - 24,5	21
24,5 - 26	22

constante constitue la phase mobile (8,81 psi, nominal initial flow = 1 mL min⁻¹). Les injections (2 µL par échantillon soit 5 ng de phénanthrène) sont réalisées en mode pulsed splitless. Les paramètres de température des différents composants sont réglés de la façon suivante : inlet, 250 °C; four, 80 à 300 °C; transfer line, 305 °C; source, 230 °C. L'identification des produits de dégradation des GLS est effectuée en mode full scan (FS, m/z de 50 à 650). La quantification est réalisée en mode selected ion monitoring (SIR) avec 3 ou 4 ions par composé identifié. Le pilotage du système GC-MS et l'analyse des données sont effectuées grâce au logiciel HPchem software G1701BA version B. Des courbes de calibration sont réalisées pour chaque composé issus de la dégradation des principaux GLS du colza (3-PPN, 3-phenylpropanenitrile; 4-PITC, 4-pentenyl isothiocyanate; 2-PEITC, 2-phenylethyl isothiocyanate; benzyl isothiocyanate, érucine, bertéroïne et goitrine). Le ratio entre l'aire de réponse du fragment le plus abondant du composé ciblé et l'aire du phénanthrène (fragment m/z 178) est utilisé pour la quantification. Chaque isothiocyanate (ITC) est exprimé en fonction des courbes de calibration du standard correspondant. Les quantités de nitriles sont par contre exprimées en équivalent 3-PPN.

- **Fractionnement RP-HPLC bio-guidé des exsudats racinaires de colza**

Un fractionnement HPLC est effectué afin d'identifier le ou les composés induisant la germination des graines d'orobanche contenus dans les extraits concentrés repris dans l'hexane anhydre (plantes cultivées en hydroponie, 3 semaines). La séparation et la détection de ces composés sont effectuées par chromatographie liquide haute pression (LaChrom Elite HPLC System, Hitachi, Pleasanton, CA, USA), équipée d'une colonne Kromasil 100 C18 (5 µm, 250 x 4,6 mm) munie d'une pré-colonne Kromasil C18 (5 µm, 10 x 4,6 mm, Sigma-Aldrich) et couplée à une pompe L-2100, un autosampler L-2200, un détecteur UV L-2400 et un four Jetstream 2 Plus (30 °C). L'ensemble du système est piloté par le logiciel EZChrom Elite software V.3.1.7. (Scientific Software Inc., San Ramon, CA, USA). La phase mobile est constituée (A) d'eau - 0,1 % d'acide acétique (v/v) et (B) d'acétonitrile - 0,1 % d'acide acétique (v/v), en utilisant le gradient détaillé dans le **tableau 1.3**, au débit de 1 mL min⁻¹. L'absorbance est suivie à 254 nm. 90 µL d'exsudats concentrés repris dans l'hexane sont injectés et les fractions sont collectées suivant le **tableau 1.4**.

Les fractions sont diluées au 1/10^{ème} dans de l'eau ultrapure, puis leur capacité à induire la germination des graines de *P. ramosa* est déterminée suivant la procédure décrite dans l'article ci-après publié dans *Plant Methods* p 149 (Pouvreau, Gaudin *et al.*, 2013). Les fractions diluées au 100^{ème} final sont testées en triplicata (témoins négatifs eau + ACN, témoins positifs GR 24 + ACN).

- **Analyses statistiques des données**

Des analyses de variance (ANOVA) sont réalisées en utilisant un modèle linéaire généralisé à l'aide des logiciels SigmaPlot version 10.0 et SigmaStat version 3.5 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA), suivi par une comparaison multiple de moyennes à l'aide du test SNK ou de la méthode Holm-Sidak ($P < 0,05$). Les pourcentages de germination et les ratios N/C sont préalablement transformés en \arcsin^{-1} de façon à les normaliser.

2 Résultats

- **Préambule**

Les premiers résultats de ce chapitre sont présentés sous la forme d'un article récemment publié dans *Plant Methods* (Pouvreau, Gaudin *et al.*, 2013). La méthodologie présentée dans cette publication a été développée en amont des criblages de l'activité stimulatrice des exsudats racinaires de colza vis-à-vis de la germination des graines d'orobanche, présentés dans ce chapitre. En effet, l'obtention d'exsudats racinaires de colza induisant la germination des graines d'orobanche a nécessité à elle seule une mise au point non-négligeable, et un nombre de tests important. Or, la technique jusqu'alors usitée consistait en un comptage sous loupe binoculaire du nombre de graines germées, méthode longue et fastidieuse du fait de la taille microscopique de ces graines. La mise au point d'une méthode de détermination haut-débit du pourcentage de germination par coloration des graines germées et lecture optique automatisée s'est donc avérée appropriée au criblage d'un grand nombre d'exsudats racinaires, et au développement d'une technique de fractionnement bio-guidé de ces exsudats.

2.1 A high-throughput seed germination assay for parasitic plants

Jean-Bernard Pouvreau†, Zachary Gaudin†, Bathilde Auger, Marc-Marie Lechat, Mathieu Gauthier, Philippe Delavault and Philippe Simier.

2.1.1. Abstract

Background

Some root-parasitic plants belonging to the *Orobanche*, *Phelipanche* or *Striga* genus represent one of the most destructive and intractable weed problems to agricultural production in both developed and developing countries. Compared with most of the other weeds, parasitic weeds are difficult to control by conventional methods because of their life style. The main difficulties that currently limit the development of successful control methods are the ability of the parasite to produce a tremendous number of tiny seeds that may remain viable in the soil for more than 15 years. Seed germination requires induction by stimulants present in root exudates of host plants. Researches performed on these minute seeds are until now tedious and time-consuming because germination rate is usually evaluated in Petri-dish by counting germinated seeds under a binocular microscope.

Results

We developed an easy and fast method for germination rate determination based on a standardized 96-well plate test coupled with spectrophotometric reading of tetrazolium salt

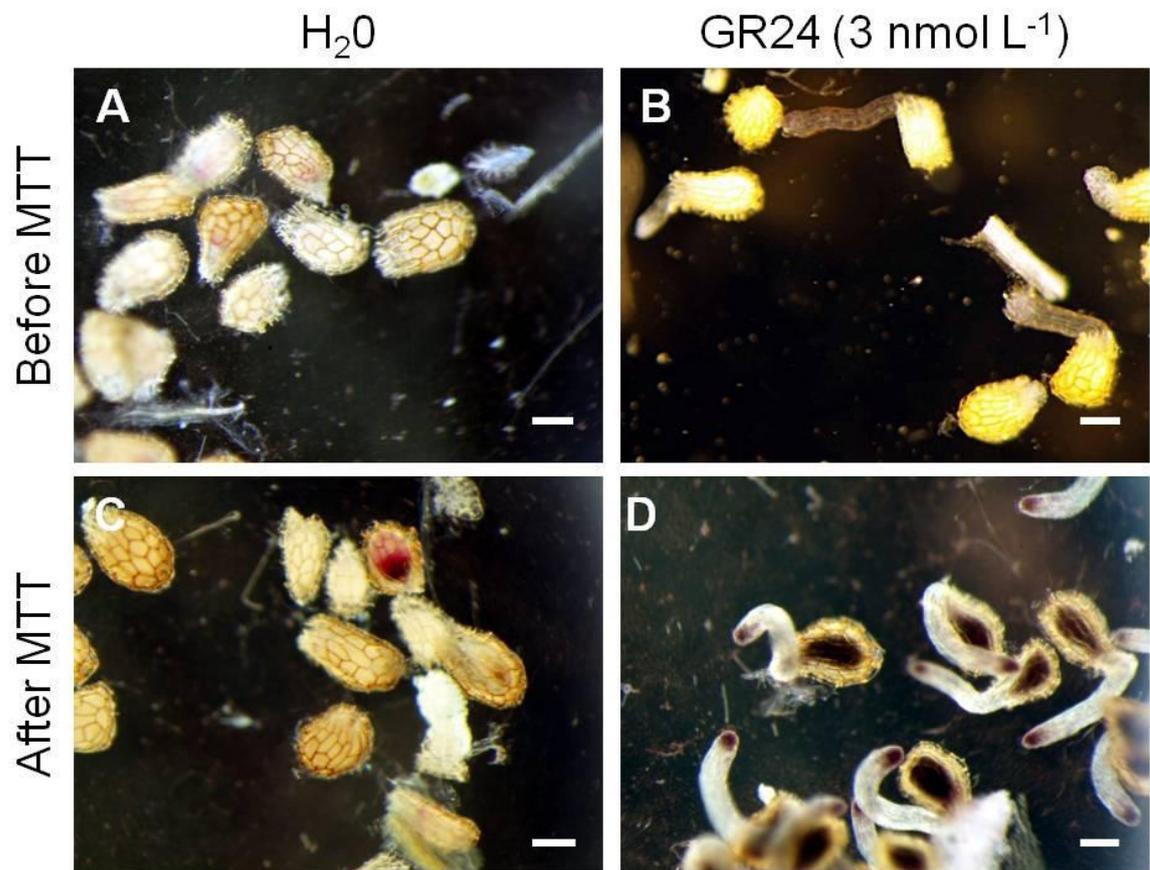


Figure 1.3: Reduction of MTT by conditioned and germinated seeds of *P. ramosa*

Control, conditioned seeds incubated without GR24 (A, C) and assays 7 days after stimulation with GR24 (3 nmol L⁻¹) (B, D). Photographs were taken before (A, B) and after (C, D) incubation with MMT for 6 hours. Bars 100 μm.

(MTT) reduction. We adapted the Mosmann's protocol for cell cultures to germinating seeds and determined the conditions of seed stimulation and germination, MTT staining and formazan salt solubilization required to obtain a linear relationship between absorbance and germination rate. Dose-response analyses were presented as applications of interest for assessing half maximal effective or inhibitory concentrations of germination stimulants (strigolactones) or inhibitors (ABA), respectively, using four parameter logistic curves.

Conclusion

The developed MTT system is simple and accurate. It yields reproducible results for germination bioassays of parasitic plant seeds. This method is adapted to high-throughput screenings of allelochemicals (stimulants, inhibitors) or biological extracts on parasitic plant seed germination, and strengthens the investigations of distinctive features of parasitic plant germination.

Keywords: Broomrape, germination, MTT, parasitic plants, *Phelipanche ramosa*, strigolactone.

2.1.2 Background

Most of the root parasitic plants grow in natural habitats in equilibrium with their host plants all-over the world. In contrast, few species adapted to a different way of living as weeds in human-made ecosystems, and cause severe damage in major crops, such as some *Orobanche* and *Phelipanche* species (broomrapes) in the Mediterranean basin in addition to some *Striga* species in Africa and Asia (Parker, 2009). Control of these root parasitic weeds is difficult and an integrated crop management is recommended to reduce the infestations using a rational combination of cultural, chemical, biological and genetic methods of control (Rubiales and Fernández-Aparicio, 2012). However, a biological trait of this kind of weeds make complex any crop management: each plant can produce an important amount of tiny seeds showing long viability in the soil.

Seed germination is a key component of pathogenicity of obligate parasitic weeds. This step is controlled allelochemically in the rhizosphere. After a short conditioning period under sufficient warm and wet conditions, seed germination is triggered by stimulant molecules which are released by the roots of neighboring host plants. Many secondary metabolites were identified as germination stimulants. Most of them corresponds to strigolactones (SLs) (Yoneyama *et al.*, 2010) but isothiocyanates (Virtue *et al.*, 2006; Auger *et al.*, 2012), dehydrocostus lactone (Joel *et al.*, 2011b), peagol, peagoldione (Evidente *et al.*, 2009), chalcones, peapolyphenols (Evidente *et al.*, 2010), soyasapogenol B and trans-22-dehydrocampesterol (Evidente *et al.*, 2011b) have been also identified as stimulants. It was recently demonstrated that seeds of *P. ramosa* needs a minimal period of conditioning before that stimulant GR24 (a synthetic SL) could trigger germination by breaking ABA dormancy (Lechat *et al.*, 2012). Inversely, broomrape seed germination can be prevented in the rhizosphere by inhibitors including trigoxazonane present in root exudates of the allelopathic plant *Trigonella*

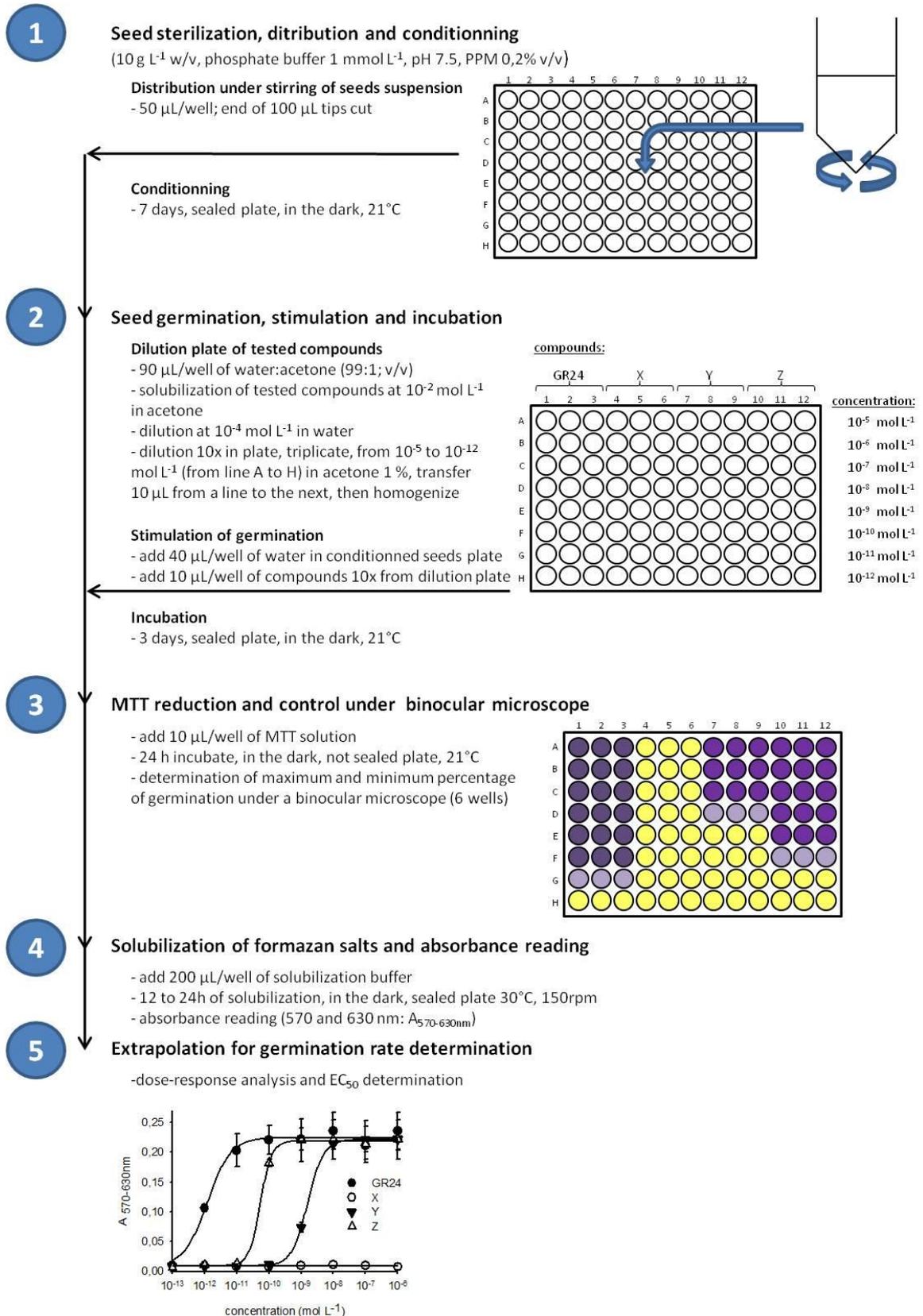


Figure 1.4 : Experimental design for the proposed high-throughput seed germination assay for root parasitic plants.

(Evidente *et al.*, 2007), several trichotecenes produced by the potential biocontrol fungi agents, *Myrothecium verrucaria* and *Fusarium compactum* (Andolfi *et al.*, 2005), 7-hydroxylated simple coumarins and both naringenin and gallic acid present in root exudates of resistant sunflower and pea, respectively (Serghini *et al.*, 2001; Mabrouk *et al.*, 2007b,a). In this context, many investigations are conducted on the identification and the characterization of the germination stimulants (e.g. Zwanenburg *et al.*, 2009; Yoneyama *et al.*, 2010; Ueno *et al.*, 2011). Fundamentally, their interest corresponds to a better understanding of the plant-plant interaction. There is also a great agronomical challenge to control these parasitic weeds, either by preventing seed germination through biocontrol agents or intercropping with allelopathic plants, or in contrast by promoting seed germination in the absence of host plants by cropping false hosts in order to reduce the seed bank of the soils (Rubiales and Fernández-Aparicio, 2012).

All these works need a rapid and reliable bioassay of seed germination allowing a high-throughput screening of molecules, root exudates or plant extracts. Until now, germination rate is usually evaluated in Petri-dish by counting germinated seeds under a binocular microscope. This method is time-consuming, tedious due to the minute size of seeds (about 200 μm in diameter, **Fig. 1.3**), and inappropriate if hundred of samples have to be analyzed. A miniaturization assay in 96-well plates is available for the screening of numerous *Arabidopsis* seedling accessions towards *P. ramosa* and *P. aegyptiaca* seed germination, and uses 10-50 seeds in water per well in which seedlings are transferred (Goldwasser and Yoder, 2001). This method remains tedious notably due to the germination rate determination by binocular microscopy. We propose in this paper to substitute this step by a spectrophotometric determination of germination rate. Indeed to make easier and faster measurements for high-throughput studies, we developed a standardized 96-wells plate germination test coupled with spectrophotometric reading of methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) reduction (Mosmann, 1983). The analog staining method using the tetrazolium salt 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride (TTC) demonstrated early changes in metabolic activity in *O. crenata* and *P. ramosa* seeds during germination (Aalders and Pieters, 1985; Gonzalez-Verdejo, 2005). Indeed TTC staining of seeds stimulated with GR24 for 5 min displayed an increase in metabolic activity 30 h after the stimulation. The radicle was observed after 40 h in seeds and germination was achieved 3 days after treatment (root protrusion) (Gonzalez-Verdejo, 2005). The tetrazolium salt systems are a mean of measuring the activity of living cells thanks to mitochondrial dehydrogenase activities (Mosmann, 1983). The proposed MTT method is simple and accurate, and yields reproducible results. We demonstrate here that the MTT method can be adapted for high-throughput germination bioassays, then giving an efficient tool for detailed investigations on seed germination, as presented for example in this paper as a proof of concept with data on the effects of ABA level on *P. ramosa* seed germination.

2.1.3 Results

The Mossman test use MTT as a marker of metabolic activities. When dissolved in a medium, oxidized MTT is yellowish in color. When applied to biological materials, the yellow MTT is reduced to purple formazan crystals by mitochondrial enzymatic activities. These crystals

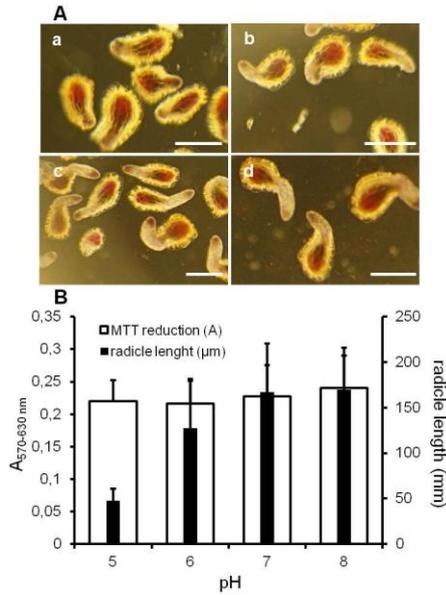


Figure 1.5 : pH impact on seed germination and radicle growth in *Phelipanche ramosa*

Conditioned seeds were stimulated with GR24 (3 nmol L^{-1}) then incubated 7 days in Na, K phosphate medium (1 mmol L^{-1}) at pH 5 (a), 6 (b), 7 (c) and 8 (d). **A-** photographs were taken after MTT incubation for 6 hours. Scale bars $200 \mu\text{m}$. **B-** pH impact on MTT reduction by absorbance measurement at 530 nm minus absorbance at 630 nm (\pm confidence intervals $\alpha=0.05$, $n=3$), radicle length (\pm confidence intervals $\alpha=0.05$, $n=400$), germination percentage were $95 \% \pm 4 \%$.

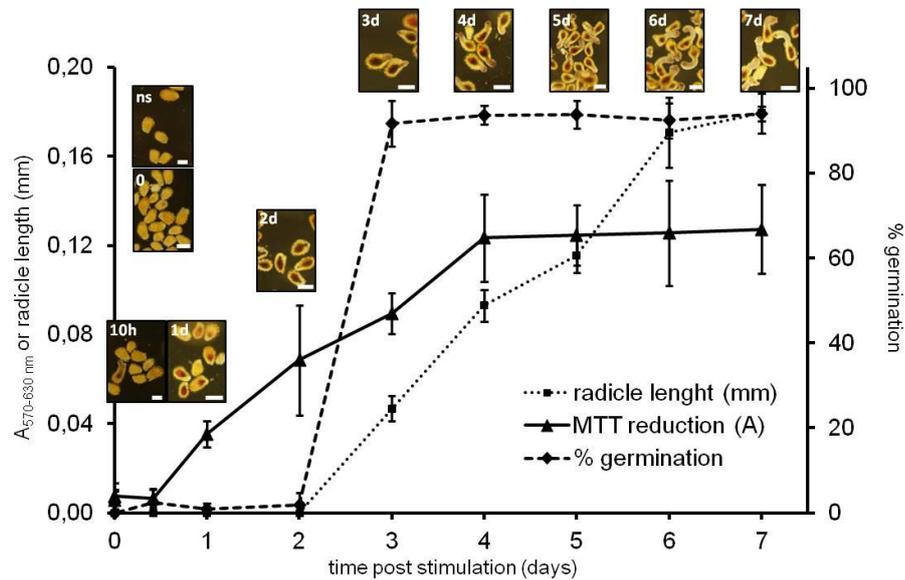


Figure 1.6 : Kinetics of seed germination and radicle growth in *Phelipanche ramosa*

Conditioned seeds of *P. ramosa* were stimulated or not ((ns) with GR24 3 nmol L^{-1} for 0, 10 hours, 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 days, then incubated with the MTT for 6 hours. Scale bars = $200 \mu\text{m}$. Kinetics of MTT reduction was followed by absorbance measurement at 530 nm minus absorbance at 630 nm ($A_{570-630\text{nm}}$), radicle length and germination percentage counting under binocular microscope (\pm confidence intervals $\alpha=0.05$, $n=8$).

are insoluble in aqueous solutions, they are dissolved in acidified isopropanol and the resulting purple solution can be then measured spectrophotometrically. Following extrapolation, the results of this assay can be expressed in term of number of viable cells. Cytotoxicity of tested molecules or biological extracts can be then routinely assessed.

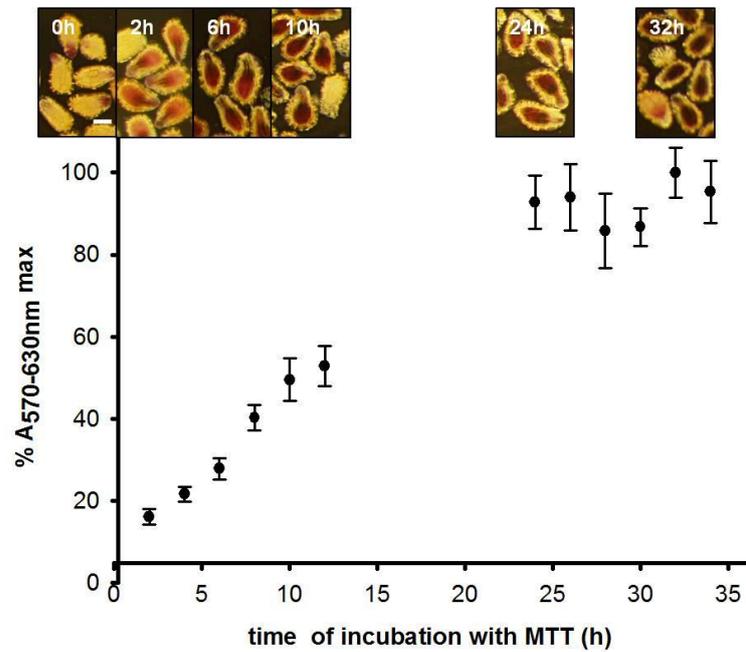
In the context of our study, when MTT was added 7 days post GR24-stimulation (dps), germinated broomrape seeds reduced MTT into formazan mainly at the apex of the radicle and in the seed body (**Fig. 1.3 B, D**). This activity was not observed in the non-germinated seeds (**Fig. 1.3 A, C**). Some of them displayed a red deposition in the seed body that did not correspond to the purple deposition of formazan salts (**Fig. 1.3C**). First, the observed differential staining between germinated seeds and non-germinated seeds facilitated the observation of the germination process under a binocular microscope. Secondly, produced formazan crystals could be solubilized for absorbance reading. Therefore the Mossman's test has been adapted and validated in order to develop high-throughput bioassays for germination of obligate parasitic plant seeds. This method could be divided in five steps summarized in **Figure 1.4**: 1) seed sterilization, seed distribution and conditioning in 96 well plates, 2) seed germination stimulation and incubation, 3) MTT reduction and visual control under a binocular microscope, 4) solubilization of formazan salts and absorbance reading and 5) extrapolation of absorbance values for determination of germination rate. First of all, some steps had to be optimized including the pH buffer for seed germination and the length of seed germination after GR24-addition, MTT incubation, and formazan salt solubilization, as detailed here below.

Optimum pH for seed germination

Phosphate buffer in the germination medium were tested at pH 5, 6, 7 and 8. MTT was added 7-dps. When assessed under binocular microscope, the germination percentage was not affected by pH and reached 95 ± 5 % (**Figure 1.5**). Similarly, following formazan crystal solubilization, absorbance was not significantly different (SNK, $p < 0.05$). However, when radicle was observed, a strong reduction in length was observed for acid pH values (**Figure 1.5**). A pH of 7.5 which did not impact germination and radicle development was chosen for MTT assay.

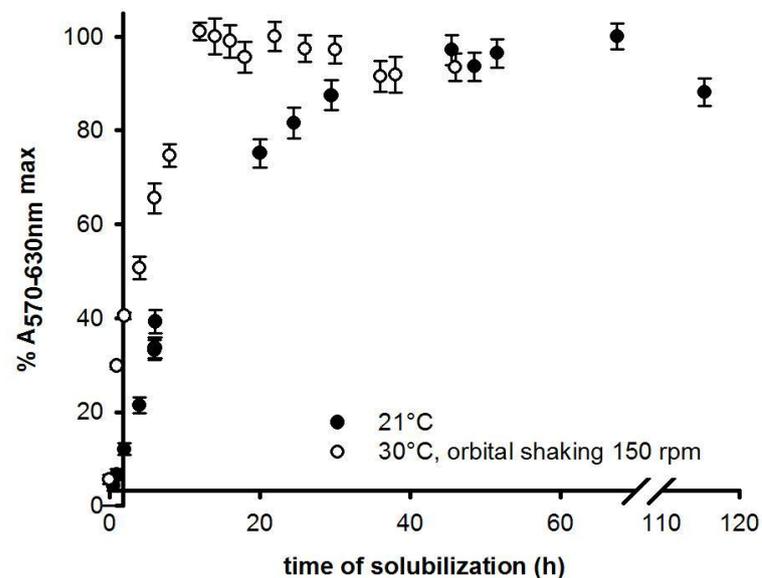
Kinetics of germination and MTT staining

The kinetics of germination rate, radicle length and MTT reduction were followed concomitantly during 7 dps in 96 well plate (≈ 125 seeds per well) (**Fig. 1.6**). GR24 applied at 3 nmol L^{-1} induced 93 ± 4 % of germination 7 dps (**Fig. 1.6**). No staining was observed during the first ten hours (**Fig. 1.6 0-10h**) except for a few spontaneously germinated seeds (2 ± 3 %, data not shown). The slight red deposition appeared in seed body at 1 dps while the purple staining marked the radicle area (**Fig. 1.6 1d**). Then MTT reduction was spread throughout the seed (**Fig. 1.6 2d**). Radicle protrusion was observed 3 dps when a small germ tube ($47 \pm 6 \mu\text{m}$) could be measured (**Fig. 1.6 3d**). Seed germination was synchronized (92 ± 5 %, $\pm\text{EC}$, $n=8$ wells). No significant change in germination rate was observed 3 dps (ANOVA, SNK, $\alpha=0.05$). The radicle elongated until 6 dps when it reached its maximum size ($176 \pm 16 \mu\text{m}$) (**Fig. 1.6 4-7d**). Therefore



Additional file 1. Time course of MTT reduction by *P. ramosa* germinated seeds.

Measurements 4 days post GR24 stimulation (3 nmol L^{-1}) and after 0, 4, 8, 12, 24, and 32 hours of incubation with MTT. Scale bars =100 μm . $A_{570-630 \text{ nm}}$ was expressed as percentage of maximum absorbance at 32h. Absorbance was measured after solubilization in the following conditions (22 h, 30°C and orbital shaking 150 rpm) ($n=8$; bar = SE).



Additional file 2. Formazan salt solubilization.

Solubilization from germinated seeds was assessed 4 days post G24 stimulation and after incubation with MTT for 24 hours at 21°C. Solubilization conditions: 21°C without shaking or 30°C under orbital shaking (150 rpm). $A_{570-630 \text{ nm}}$ was expressed as percentage of maximum absorbance measured after a solubilization period of 67h at 21°C or 12h at 30°C ($n = 24$; bar = SE).

sensus stricto germination occurred in the first 3 dps and the following 3 days consisted in post-germination development. A significant reduction of MTT could be detected spectrophotometrically from 1 dps (ANOVA, SNK, $\alpha=0.05$). The activity increased regularly until 4 dps and then kept a maximal and stable value. In accordance with the kinetics obtained in these experimental conditions (21°C, pH 7.5), **4 dps duration was chosen for the MTT assay as an appropriate timing for maximal germination rate and MTT reduction.**

Length of MTT incubation

The reduction of MTT was observed 4 dps only at the apex of the radicle after two hours of incubation in the MTT medium (**Additional file 1A**), while it was spread throughout the germinated seeds over 6h of incubation. As shown by absorbance determination, once formazan was solubilized MTT reduction in germinated seeds was optimal for a 24h-incubation in the MTT medium (Additional file 1B; ANOVA, SNK, $\alpha=0.05$). Therefore, **in accordance with the kinetics**, 24h-incubation in the MTT medium of the germinated seeds (4 dps) was chosen for the MTT assay.

Length of formazan salt solubilization

Using the Mossman procedure without modifications, absorbance was low few minutes after addition of solubilization buffer since most of the formazan salt deposition remained in the seed body. Germinated seeds are structurally more complex than cells due to the presence of teguments and others tissues, then the solubilization step needed to be extended. First, formazan salt solubilization from seeds was followed by absorbance measurement during incubation in culture chamber conditions without agitation (21°C, darkness, **Additional file 2** Maximum absorbance was obtained after 40 h of incubation and remained stable during 24 h (**Additional file 2**). Complete solubilization of formazan from seeds at this time point was confirmed through microscope observations (data not shown). The duration of solubilization could be significantly reduced by incubating the plates at 30°C in darkness under orbital shaking (150 rpm). Less than 22 h **was** required in those conditions for complete formazan solubilization and the absorbance was also stable during one day. **These conditions (30°C, 22h, under shaking) were selected for the MTT assay.**

Linear relationship between MTT reduction and germination rate

To prove that the test can be used quantitatively to estimate germination rate, germination assays in 96-well plates were prepared using *P. ramosa* conditioned seeds and various GR24 concentrations from 10^{-15} to 10^{-6} mol L⁻¹. Controls were done without GR24 and with GR24 at used concentrations without conditioned seeds. MTT solution was added in each well 4 dps. Following 24h-Incubation in MTT solution, plates were transferred at 30°C in darkness under orbital shaking (150 rpm) during 24 h for complete formazan salt solubilization. No MTT reduction was observed in the control wells containing only GR24 solutions (data not

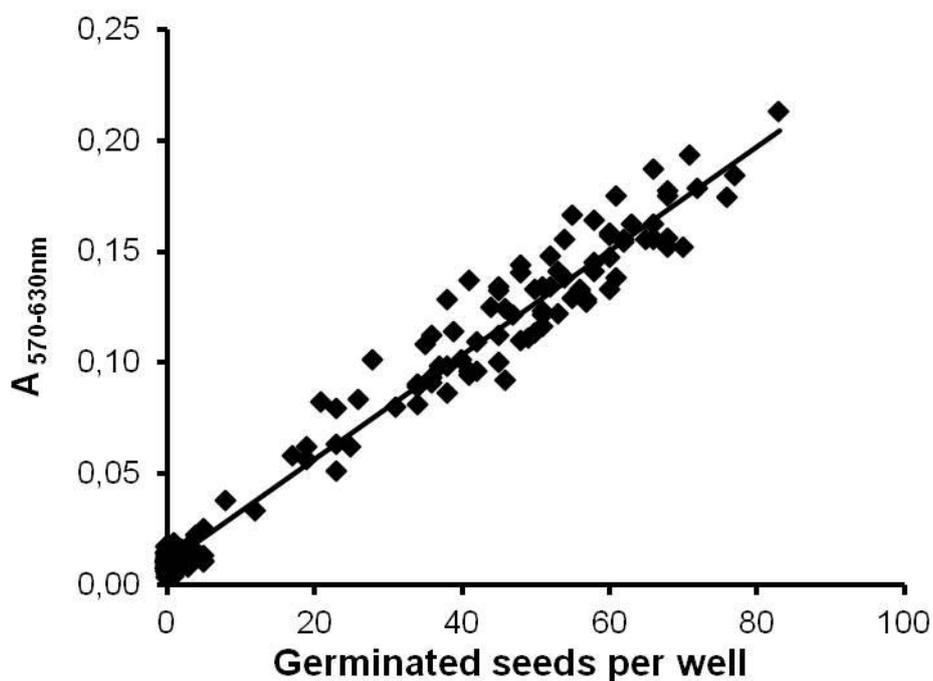


Figure 1.7 : Linear relationship between MTT reduction and germination rate for *P. ramosa* seeds $y = 0.0023 x + 0.01$; $R^2 = 0.976$, measurements 4 days post GR24 stimulation.

Table 1.5 : Linear relationship between MTT reduction and seed germination rate for various parasitic plants. A, Absorbance; gs, number of germinated seeds per well.

<i>Species</i>	lot	Seeds/well	Linear regression	R^2
<i>Phelipanche ramosa</i>	St Martin de Fraigneau, France, 2005	120	$A = 0.0023 \text{ gs} + 0.011$	0.976
<i>Orobanche cumana</i>	Longeville-sur-mer, France, 2009	110	$A = 0.0019 \text{ gs} + 0.009$	0.965
<i>Orobanche minor</i>	Japan, 2010	80	$A = 0.0043 \text{ gs} + 0.032$	0.977
<i>Striga hermonthica</i>	Gadarif, Soudan, 1999	90	$A = 0.0127 \text{ gs} + 0.016$	0.920

shown), proving that GR24 did not interact with MTT through oxidoreduction processes. As observed in **Figure 1.7 and Table 1.5**, the relationship between germinated seeds per well or germination percentage and absorbance was linear ($R^2=0.976$ and $R^2=0.891$, respectively). **Therefore absorbance could be converted into germination efficiency expressed as either germinated seed number per well or germination percentage.**

Using similar conditions and time courses, linear relationship between absorbance and germination efficiency was demonstrated for seeds of three other parasitic plants, *O. minor*, *O. cumana* and *S. hermonthica* (**Tab. 1.5**), despite difference in germination velocity could be observed according to the species: *O. cumana* and *S. hermonthica* seeds germinated and developed a long radicle (length > 200 μm) 4 dps, while no radicle emergence from micropyle was observed from germinated *O. minor* seeds at this time point.

Technical Tips and Tricks

Seed distribution in plate is the main critical step of the proposed protocol. Because the signal is proportional to the germinated seed number per well, seed distribution must be homogenous between wells in order to valid linear relationship between absorbance and germination percentage. So the suspension of sterilized seeds must be maintained in the tube under stirring throughout seed distribution in plate using a pipette. The end of tips must be cut to avoid seed clogging and mismatch seed distribution. Seed number per well should be both sufficient to neglect low variation of seed number per well and not too high for absorbance reading and control under microscope. Using the described conditions, 125 ± 11 seeds are usually added per well (\pm SD, $n=96$). For seeds difficult to maintain in suspension, as observed in this study for *O. cumana* and *O. minor*, addition of Silwet-L77 or Triton X-100 as a detergent in the suspension medium facilitated seed distribution in plate. Concentration should be less than 0.001% otherwise higher concentrations inhibited germination (data not shown).

Most of the tested compounds were dissolved in solvents such as acetonitrile, acetone, ethanol, or dimethylsulfoxide. Acetone, acetonitrile or ethanol percentages less than 0.1 % did not alter the response of *P. ramosa* seed to GR24 (EC50 and maximum germination percentage). Dimethylsulfoxide can be used up to 1 % (data not shown).

Compatibility of different buffers with seed germination was checked. Sodium phosphate buffer was compatible up to 10 mmol L^{-1} while sodium-potassium phosphate and HEPES buffers can be used up to 20 mmol L^{-1} . Higher concentrations dramatically inhibited *P. ramosa* seed germination (data not shown). Therefore HEPES or phosphate buffer were used routinely from 1 to 5 mmol L^{-1} at pH 7.5.

Despite seed sterilization and precautions during experiments, MTT reduction could be performed by contaminant microbial dehydrogenases in wells, then generating noise or false positives. To overcome this risk, Plant Preservative Mixture™ (PPM), a heat-stable broad spectrum biocide (Guri and Patel, 1998), has been added to the Na, K phosphate buffer before seed suspension and distribution in each well. PPM concentrations from 0.01 to 0.1 % did not

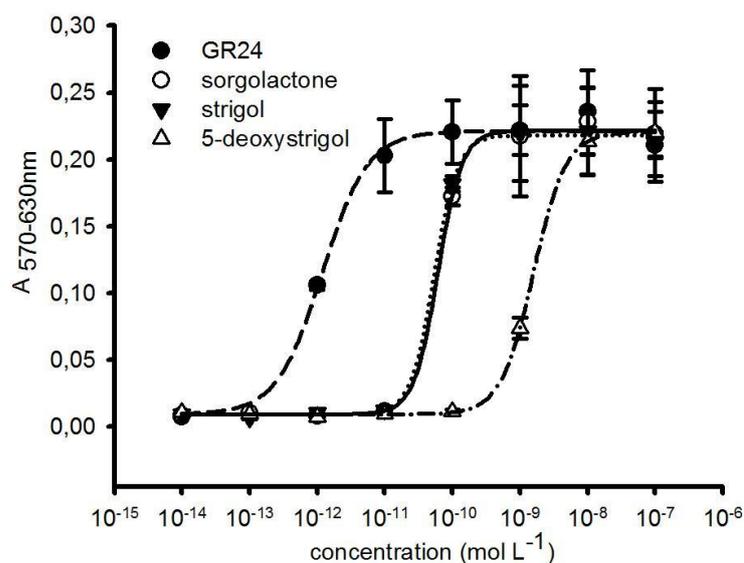


Figure 1.8: Activities of strigolactones on *P. ramosa* seed germination

Dose response activities of sorgolactone, strigol, 5-deoxystrigol and GR24 are modeled using a Four Parameter Logistic Curve (sorgolactone, solid line; strigol, dot line; 5-deoxystrigol, dash-dot line and GR24, dash line).

Table 1.6: Activity of different strigolactones on *P. ramosa* seed germination.

Analyses were performed with a Four Parameter Logistic Curve (maximum of absorbance, Amax).

	EC ₅₀ (mol L ⁻¹ ± SE)	A max (± SE)	R ²
Sorgolactone	6.1 ± 0.9 10 ⁻¹¹	0.222 ± 0.003	0.999
Strigol	5.4 ± 0.8 10 ⁻¹¹	0.218 ± 0.002	0.999
5-deoxystrigol	1.6 ± 0.05 10 ⁻⁹	0.221 ± 0.002	1.000
GR24	1.4 ± 0.4 10 ⁻¹²	0.222 ± 0.007	0.989

Table 1.7 : GR24 activity on seed germination in various parasitic plants

Analyses were performed with a Four Parameter Logistic Curve (maximum of germination percentage, % max).

	EC ₅₀ (mol L ⁻¹ ± SE)	% max (± SE)	R ²
<i>Phelipanche ramosa</i>	1.4 ± 0.4 10 ⁻¹²	89 ± 3	0.999
<i>Orobanche cumana</i>	4.0 ± 1.1 10 ⁻⁹	80 ± 3	0.976
<i>Orobanche minor</i>	1.2 ± 0.3 10 ⁻⁸	83 ± 4	0.936
<i>Striga hermonthica</i>	2.4 ± 0.7 10 ⁻¹¹	54 ± 2	0.912

affect the dose-response curve of GR24 while concentrations above 1% inhibited *P. ramosa* seed germination (data not shown). PPM was usually used at 0.1% for the MTT assay.

- **Examples of application as proofs of concept**

Interest for dose-response analysis

Standard MTT assay in 96-well plate was checked for dose-response analysis with *P. ramosa* seeds exposed to a large range of concentrations of candidate compounds (**Fig. 1.8**). Using only one 96-well plate in this example, dose-response curves were obtained, with dilution replicates, for three natural SL and GR24 between 10^{-14} and 10^{-7} mol L⁻¹. Half maximal effective concentration EC₅₀ and maximum of germination percentage of each compound were determined using a Four Parameter Logistic Curve (**Tab. 1.6**). EC₅₀ reflects both the stimulant affinity to the receptor and the effectiveness of the induced response. In this example, since the four SLs triggered high and similar values of maximum germination (ANOVA, $P < 0.05$), EC₅₀ can be discussed as a specific indicator of SL affinity to the receptor. So GR24 displayed the highest affinity, with EC₅₀ at the picomolar range as also reported in previous studies for this *P. ramosa* genotype (Auger *et al.*, 2012; Boyer *et al.*, 2012). Sorgolactone and strigol affinities were about 50-fold lower while 5-deoxystrigol affinity was about 1000-fold lower (EC₅₀ at the nanomolar range). This example proves that the MTT assay is appropriate for rapid and robust comparison of stimulant activities and will make easier structure-activity relationship studies (Yoneyama *et al.*, 2009; Cohen *et al.*, 2013; Zwanenburg and Pospíšil, 2013).

Interest for phenotypic studies

Standard MTT assay in 96-well plate was checked for assessing susceptibility of seeds from four parasitic plants to GR24 (**Tab. 1.7**). One dilution plate of GR24 in triplicate from 10^{-6} to 10^{-13} mol L⁻¹ was used. In this example, *P. ramosa* seeds displayed the highest sensitivity to GR24 at the picomolar range while *O. cumana* and *O. minor* seeds displayed EC values at the nanomolar range. Those findings support the hypothesis of variability and evolution of SLs receptors in parasitic plants (Boyer *et al.*, 2012; Cohen *et al.*, 2013; Zwanenburg and Pospíšil, 2013), and prove the MTT assay is appropriate for discriminating different parasitic plant species or genotypes or races according to their sensitivity to germination stimulants. Moreover, the MTT assay is also adapted to evaluate the stimulant activity of plant root exudates on parasitic plant seed germination. As proof of concept, **Figure 1.9** shows the divergent activity of two oilseed rape lines on *P. ramosa* seed germination.

Interest for physiological studies

GR24 stimulates *P. ramosa* seed germination by breaking ABA dormancy (Lechat *et al.*, 2012). Experiments using two 96-well plates with various ABA and GR24 concentrations proved

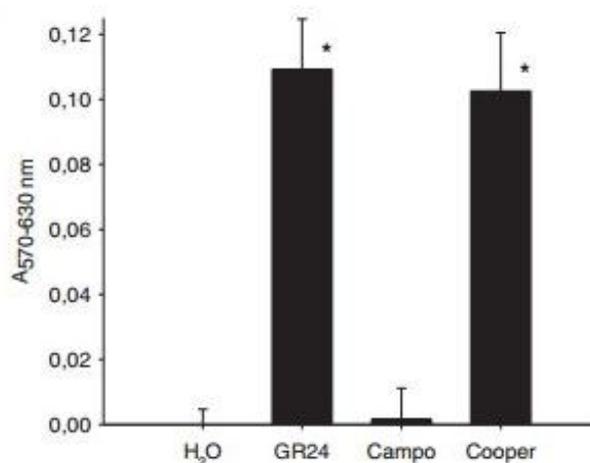


Figure 1.9 : Root exudates activity of two Brassica napus elite lines on *P. ramosa* seed germination. Negative control, H₂O; synthetic stimulant, GR24 3 nmol L⁻¹ (means ± confidence intervals, α=0.05, n=6). Bars with asterisk are significantly different from the negative control (Holm-Sidak method, P<0.05).

Table 1.8: Antagonistic role of ABA versus GR24 activities on seed germination in *P. ramosa*. A- ABA IC₅₀ versus GR24 concentration. B- GR24 EC₅₀ versus ABA concentration (maximum of absorbance, A_{max}; maximum of germination percentage, % max; not determined, nd).

A

GR24 (mol L ⁻¹)	IC ₅₀ (mol L ⁻¹ ± SE)	A max (± SE)	%max (± SE)
1 10 ⁻⁸	2.3 10 ⁻⁶ ± 6 10 ⁻⁷	0.332 ± 0.009	81 ± 0.3
1 10 ⁻⁹	1.4 10 ⁻⁶ ± 1.4 10 ⁻⁷	0.377 ± 0.004	92 ± 1.5
1 10 ⁻¹⁰	1.2 10 ⁻⁶ ± 2.8 10 ⁻⁷	0.395 ± 0.013	94 ± 0.8
5 10 ⁻¹¹	1.4 10 ⁻⁶ ± 4.2 10 ⁻⁷	0.387 ± 0.013	94 ± 0.8
1 10 ⁻¹¹	1.6 10 ⁻⁶ ± 1.1 10 ⁻⁷	0.394 ± 0.014	96 ± 1.1
5 10 ⁻¹²	1.0 10 ⁻⁶ ± 1.1 10 ⁻⁷	0.366 ± 0.013	89 ± 0.6
1 10 ⁻¹²	nd	0.024 ± 0.12	4 ± 0.4

B

ABA (mol L ⁻¹)	EC50 (mol L ⁻¹ , ± SE)	A max (± SE)	%max (± SE)
5 10 ⁻⁵	nd	0.004 ± 0.002	2 ± 2
1 10 ⁻⁵	nd	0.004 ± 0.002	1 ± 2
5 10 ⁻⁶	2.8 10 ⁻¹² ± 1.2 10 ⁻¹²	0.070 ± 0.020	15 ± 2
1 10 ⁻⁶	4.8 10 ⁻¹² ± 3.1 10 ⁻¹²	0.260 ± 0.010	62 ± 1
5 10 ⁻⁷	3.1 10 ⁻¹² ± 2.1 10 ⁻¹²	0.330 ± 0.010	80 ± 3
1 10 ⁻⁷	4.8 10 ⁻¹² ± 2.5 10 ⁻¹²	0.370 ± 0.010	89 ± 1
5 10 ⁻⁸	4.8 10 ⁻¹² ± 2.5 10 ⁻¹²	0.370 ± 0.010	89 ± 1
1 10 ⁻⁸	4.6 10 ⁻¹² ± 8.3 10 ⁻¹²	0.400 ± 0.010	95 ± 1
5 10 ⁻⁹	4.5 10 ⁻¹² ± 7.7 10 ⁻¹²	0.400 ± 0.010	96 ± 1
1 10 ⁻⁹	4.6 10 ⁻¹² ± 2.6 10 ⁻¹²	0.400 ± 0.020	98 ± 2
1 10 ⁻¹⁰	1.3 10 ⁻¹² ± 3.6 10 ⁻¹²	0.390 ± 0.020	94 ± 2
0	3.0 10 ⁻¹² ± 0.7 10 ⁻¹²	0.350 ± 0.010	85 ± 1

that ABA inhibits germination in the presence of GR24 in a dose dependant manner (**Table 1.8A**). ABA IC_{50} ranged between 1.0 and $2.3 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, without significant difference in the GR24 concentrations range tested (SNK, $p < 0.05$). Using ABA concentrations lower than ABA IC_{50} , no significant difference was obtained for maximum absorbance or maximum germination percentage with a large range of GR24 concentrations between $1 \cdot 10^{-8}$ and $5 \cdot 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$ (SNK, $p < 0.05$). In the same way, ABA did not affect GR24 EC_{50} (SNK, $p < 0.05$; **Table 1.8B**). Nevertheless ABA reduced significantly maximum germination percentage for GR24 concentration higher than $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (SNK, $p < 0.05$). These findings prove that ABA-related inhibition and GR24-related stimulation on *P. ramosa* seed germination are antagonist and uncompetitive processes. Thus standard MTT assay in 96-well plate is also an appropriate tool to study the physiological aspects of seed germination in parasitic plants.

2.1.4 Discussion

Using a microscope, the germination rate of the tiny seeds of parasitic plants is usually determined by counting seeds showing a protruded radicle through the seed coat (Galindo *et al.*, 2002; Yoneyama *et al.*, 2009; Evidente *et al.*, 2009). As reported for other dyes such as TTC (Aalders and Pieters, 1985; Gonzalez-Verdejo, 2005), blue ink or Coomassie Blue (Román *et al.*, 2007), MTT staining contrasts the germinated seeds, and then facilitates observation and counting. On the other hand, unlike those colorants, MTT staining is appropriate for a spectrophotometric reading. So we described here a standard MTT assay in plate for the spectrophotometric determination of germination rates of parasitic plant seeds. It was carried out according to the Mossman's procedure for cell cultures (Mosmann, 1983) with major modifications due to the structural complexity of seeds compared to cells.

The kinetics of MTT staining during seed germination facilitates the discrimination between the induction of germination that was characterized by purple staining due to metabolic activities of the embryo, and the radicle protrusion and elongation (**Fig. 1.6**). As shown for *P. ramosa* seeds (**Fig. 1.5**), germination was induced by GR24 under a large range of pH while radicle protrusion and elongation were strongly affected by acid pH values. Within the MTT assay, pH effects on radicle length did not impact the absorbance reading since absorbance was correlated to germination rate independently to radicle elongation (**Fig. 1.5 and 1.7**). Within the classical method using a microscope (without MTT), the distinction between non germinated seeds and germinated seeds with a very short protruded radicle (= false negative) is very difficult, increasing the risk of germination rate underestimation. The proposed spectrophotometric MTT assay gives a significant advantage for preventing these false negatives. However, because this method is not suitable to discern effects on radicle elongation, it is not relevant for testing compounds that affect radicle elongation.

XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) or other tetrazolium salts that form water-soluble formazan has been proposed to replace MTT in the Mossman's procedure (Long *et al.*, 2008), yielding higher sensitivity and a higher dynamic range. In addition, the formed formazan dye is water soluble, then avoiding the final solubilization step. While first attempts to replace MTT by XTT in the incubation medium of *P. ramosa* seeds were

Table 1.9 : Advantages and disadvantages of germination determination methods.

	Classical microscope assay	Spectrophotometric MTT assay
Duration of the experiment	7 days	6 days
Duration of the reading step (96 well plate)	2-3 h	< 5 min
Sensitivity to false negative	yes	no
Radicle elongation determination	yes	no

positive (data not shown), experiments for XTT assay standardization were not carried out. Indeed, the fact that XTT does not contrast seeds represents a major inconvenient for the optical control of seed germination in plate.

Conditioning and germination of parasitic plants seeds could be affected by environmental conditions as temperature, light, water potential or salinity (Kebreab and Murdoch, 1999a ; Matusova *et al.*, 2004 ; Takagi *et al.*, 2009 ; Hassan *et al.*, 2010). For *P. ramosa*, the developed method has shown that seeds germinated over a large range of pH (5 to 8). This finding proves that the spectrophotometric MTT assay is adapted to high throughput studies of environmental factors on kinetics of parasitic plant seed germination. The MTT assay is also appropriate for a number of other (high throughput) studies on parasitic plants including structure-activity relationship analysis of germination stimulants or inhibitors (allelochemicals), bioguided purification of natural allelochemicals from plant extracts, and studies on seed response to allelochemicals through pharmacological approaches. The MTT assay is also benefit for screening a number of plant root exudates (**Fig. 1.9**) as part of studies on host spectrum of parasitic plants, screenings of germplasms for resistance breeding, and applied researches on allelopathic plants acting as potential catch or false host crops in order to reduce the parasitic pressure in infested fields.

2.1.5 Conclusions

To make easier and faster measurements of germination rate of parasitic plant seeds for high-throughput studies, we developed a spectrophotometric and standardized 96-well plate assay. The assay is based on the relationship between the induction of seed germination by stimulants and the increase in dehydrogenase activities of germinating seeds that is determined by reduction of exogenous methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT). Compare to the classical microscope assay, the developed MTT assay decreases the length of experiments and especially the duration of the reading step (**Tab. 1.9**). In addition, several examples of applications were also shown, attesting that this assay will be a useful tool for both fundamental and applied researches on plant-parasitic plant interactions.

2.1.6 Methods

Seeds

Seeds of *Phelipanche ramosa* L. Pomel (genetic type 1, (Voisin *et al.*, 2011)) were collected in 2005 from Saint Martin de Fraigneau, France, on broomrape parasitizing winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). Seeds of *Orobanche cumana* Wallr. were collected in 2009 from Longeville-sur-mer, France, on broomrape parasitizing sunflower (*Helianthus annuus* L.); seeds of *Orobanche minor* Sm were kindly provided by Pr K. Yoneyama (Japan) and seeds of *Striga*

hermonthica (Del.) Benth were collected in 1999 from Gadarif, East Sudan. The seeds were stored dry in the dark at 25 ° C until use.

Seeds of *Brassica napus* (L.) elite lines, Campo and Cooper, were provided by the breeder companies, Dekalb and Advanta, respectively. Plants were grown and root exudates were collected 7 weeks after sowing according to Labrousse *et al.* (2001).

Chemicals

GR24, sorgolactone, strigol and 5-deoxystrigol were kindly provided by Dr F-D. Boyer (Boyer *et al.*, 2012). ABA and MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). They were resuspended in acetone at 10 mmol L⁻¹, then diluted with water at 1 mmol L⁻¹ (water/acetone; v/v; 99/1). Control was prepared as acetone 1 % (v/v). Dilutions of 1 10⁻³ mol L⁻¹ to 1 10⁻¹⁵ mol L⁻¹ were then performed in water/acetone (v/v; 99/1). ABA was solubilized in basified water at 10 mmol L⁻¹ and then diluted in phosphate buffer (1 mmol L⁻¹, pH 7.5) from 10⁻³ to 10⁻¹⁰ mol L⁻¹. MTT was prepared at 5 g L⁻¹ in distilled water then filtered at 0.2 µm (RC filters, Millipore) and stored at 4°C in the dark.

MTT assays

1 – Seeds sterilization, distribution and conditioning in 96 well plates

Seeds were surface-sterilized according to Vieira Dos Santos *et al.* (2003) with some minor modifications. Seeds were surface-sterilized in vigorous agitation in a 9.2° sodium hypochlorite solution for 5 min. Hypochlorite was removed by washing three times 30 s then three times 5 min with autoclaved deionised water. Then seeds were resuspended at a density of 10 g L⁻¹ (dry seed weight/v) in Na,K phosphate buffer (1 mol L⁻¹, pH 7.5) containing PPM 0.2% (Plant Preservative Mixture, Kalys, Bernin, France), and distributed under stirring in 96-well plates (Cell Culture Multiwell Plate Cellstar; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany), around 50 µL ≈ 125 seeds per well. Seeds were conditioned in sealed plates during 7 days at 21°C in darkness, excepted *S hermonthica* seeds that were conditioned at 30 °C.

2- Seed germination, stimulation and incubation

Fresh root exudates (0.2 µm filtered), GR24, ABA or control were added and volumes were adjusted to 100 µL with water. Phosphate buffer was therefore adjusted at 500 µmol L⁻¹ (pH 7.5) and acetone at 1/1000 (v/v). Negative controls were made with solvents, buffer and seeds minus tested chemicals. Blanks containing complete assay without seeds were also included in each test. Each molecule and concentration was tested on 3 well replicates against 3 replicates of blanks. Plates were incubated for seed germination as previously described at 21°C or 30°C according to the species.

3- MTT reduction and control under a binocular microscope

The MTT assays were carried out according to Mosmann (1983) with modifications. Ten micro liters of MTT solution per well was added. Plates were replaced in culture chamber culture for 24 hours in darkness or overnight (unsealed plates, at 21 or 30 °C according to the species). As a control of seed germination and MTT staining, both germinated seeds showing radicle protrusion and non germinated seeds were counted before and after MTT addition and incubation using a zoom stereo microscope with 0.5 and 2 x objectives with darkfield illumination (SZX10, Olympus). Images were captured with a digital camera (E-330, Olympus) controlled by cell-A software (Olympus, Japan).

4- Solubilization of formazan salts and absorbance reading

Two hundred micro liters of solubilization buffer (Triton X-100 10%, HCl 0.04 mol L⁻¹ in isopropanol) per well were added. Formazan salt deposition was solubilized in the lysis buffer for 22 hours in orbital shaker (150 rpm, 30°C). Absorbance was read using a *EL800* Absorbance Microplate Reader (Biotek, Winooski, United States) equipped with 570 nm and 630 nm filters. For each well, the absorbance at a reference wavelength of 630 nm was subtracted from a test absorbance of 570 nm ($A_{570-630nm}$).

5- Extrapolation of absorbance values for germination rate determination and dose response curves analysis

Linear regression, absorbance as a function of germination percentage, was computed with SigmaPlot 10.0. Dose-response curves, absorbance or germination percentage as a function of GR24 or ABA concentration, were modeled with a four parameter logistic curve computed with SigmaPlot 10.0.

Statistical analysis

Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) with EC₅₀, IC₅₀ or germination percentage as the factor. Germination percentages were previously \sin^{-1} (square root)-transformed to normalize the ratios.

List of abbreviations

A: Absorbance; ABA: Abscissic acid; dps: Day post stimulation; EC₅₀: Half maximal effective concentration; IC₅₀: Half maximal inhibitory concentration; MTT: Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide; PPM: Plant Preservative Mixture; SL: Strigolactones; TTC : 2,3,5 Triphenyl Tetrazolium chloride; XTT : 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

JBP and ZG designed the MTT assay. BA, MML and MG checked its efficiency for a number of applications, 3 of which were presented in the paper. PS and PD supervised ZG and MML's thesis, respectively, and drafted the manuscript. JBP supervised also ZG's thesis.

Acknowledgements

This work was partially supported by funding awarded to the Ph-D students ZG and MML from the French Ministry of Education and Research.

Authors

Jean-Bernard Pouvreau[†] ; Laboratoire de Biologie et de Pathologie Végétales EA 1157, SFR 4207 QUASAV, Nantes University, 44322 Nantes, France ; Jean-Bernard.Pouvreau@univ-nantes.fr.

Zachary Gaudin[†] ; Laboratoire de Biologie et de Pathologie Végétales EA 1157, SFR 4207 QUASAV, Nantes University, 44322 Nantes, France ; Zachary.Gaudin@univ-nantes.fr.

Bathilde Auger ; Laboratoire de Biologie et de Pathologie Végétales EA 1157, SFR 4207 QUASAV, Nantes University, 44322 Nantes, France ; bath.auger@gmail.com.

Marc-Marie Lechat ; Laboratoire de Biologie et de Pathologie Végétales EA 1157, SFR 4207 QUASAV, Nantes University, 44322 Nantes, France ; Marc-Marie.Lechat@etu.univ-nantes.fr.

Mathieu Gautier ; Laboratoire de Biologie et de Pathologie Végétales EA 1157, SFR 4207 QUASAV, Nantes University, 44322 Nantes, France ; mathieu.gauthier84@gmail.com.

Philippe Delavault ; Laboratoire de Biologie et de Pathologie Végétales EA 1157, SFR 4207 QUASAV, Nantes University, 44322 Nantes, France ; Philippe.Delavault@univ-nantes.fr.

Philippe Simier ; Laboratoire de Biologie et de Pathologie Végétales EA 1157, SFR 4207 QUASAV, Nantes University, 44322 Nantes, France ; Philippe.Simier@univ-nantes.fr.

[†] These authors have contributed equally to the work.

Corresponding author: Jean-Bernard Pouvreau

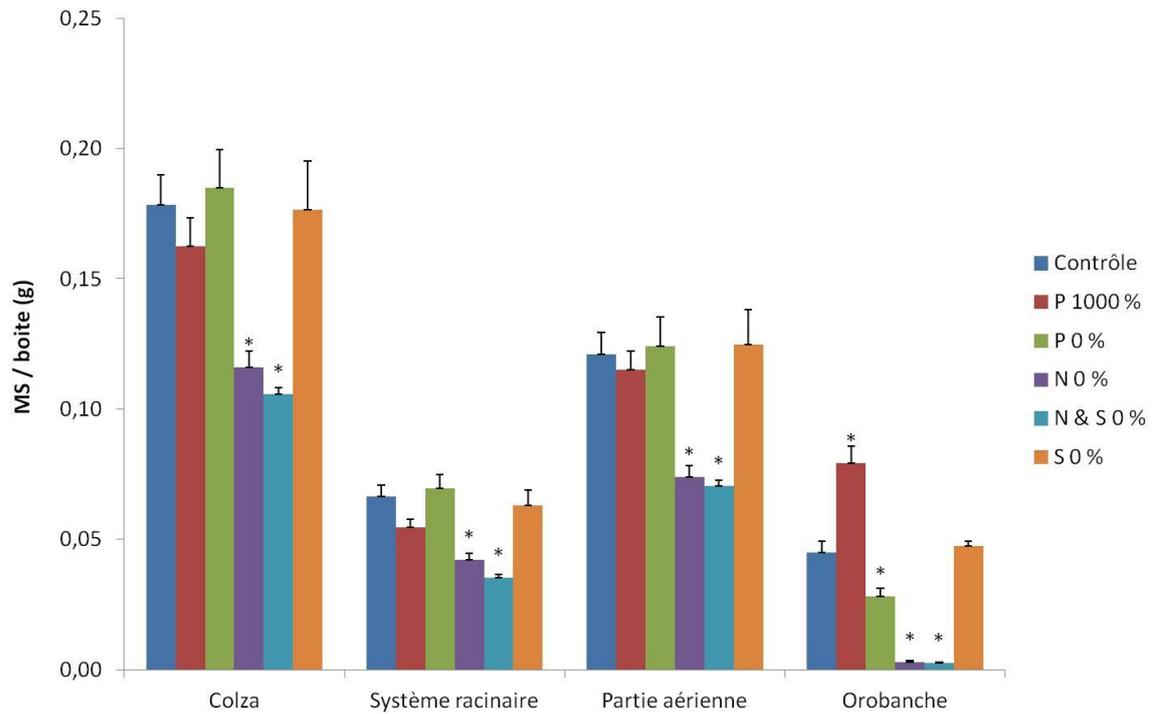


Figure 1.10: Impact de différents régimes de fertilisation sur la biomasse des différents compartiments de l'interaction (co-culture en mini-rhizotron ; moyenne \pm SE, n = 12, ANOVA, * $P < 0,05$ versus contrôle TT, méthode Holm-Sidak).

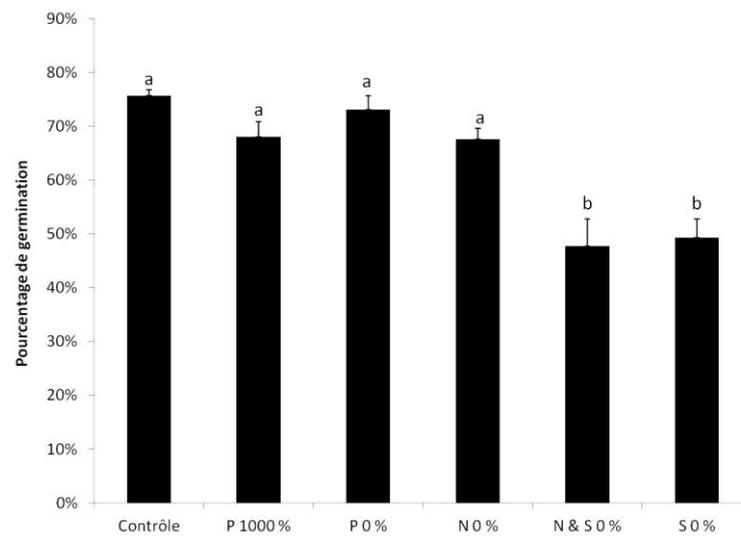


Figure 1.11 : Impact de différents régimes de fertilisation sur la capacité du colza à induire la germination des graines d'orobanche (co-culture en mini-rhizotron ; moyenne \pm SE, n = 12, ANOVA, * $P < 0,05$ versus contrôle TT, test SNK).

2.2 Impact des différents régimes de fertilisation

- **Impact des différents régimes de fertilisation sur la biomasse de l'interaction cultivée en mini-rhizotron**

Chez le colza infesté, seules les carences en azote et en azote couplée au soufre (N0 % et NS0 %) réduisent significativement les biomasses racinaires et aériennes (**Fig. 1.10**). Par contre, la carence en soufre (S0 %) n'impacte pas le développement de la plante. Ainsi, dans ces conditions de culture, seule une carence en azote est dommageable pour le colza, avec une réduction équivalente des biomasses aériennes et racinaires (ratio parties aériennes/racinaires constant).

Chez l'orobanche, seule la carence en soufre (S0 %) n'impacte pas significativement la biomasse totale. A l'inverse, une forte dépendance de la biomasse sèche totale des orobanches fixées vis-à-vis du régime de fertilisation est observée pour les autres conditions. En effet, la diminution la plus importante (95 %) est constatée lors de carences en azote (N0 % et NS0 %). La carence en phosphate (P0 %) s'accompagne quant à elle d'une réduction d'environ 40 % de la biomasse totale des orobanches. En contrepartie, il est intéressant de noter qu'une fertilisation enrichie en phosphate (P1000 %) induit un net accroissement de la biomasse des orobanches fixées, de l'ordre de 75 %.

Une étude plus approfondie sur la capacité du colza, soumis à ces contraintes nutritionnelles, à induire la germination des graines d'orobanche et sur la capacité des graines germées à se fixer aux racines hôtes (sensibilité du colza) a ensuite été réalisée.

- **Impact des différents régimes de fertilisation sur la capacité du colza à induire la germination des graines d'orobanche rameuse**

Le pourcentage de germination des graines d'orobanches est déterminé à proximité des racines de colza dans le système de mini-rhizotron en réponse aux différents régimes de fertilisation. Comparé aux conditions témoins (fertilisation avec le milieu TT ½) dans lesquelles les graines d'orobanches germent à 75 % à proximité des racines hôtes, deux groupes de régimes de fertilisation sont distinctement identifiables (**Fig. 1.11**). L'enrichissement en phosphate (P1000 %) et les carences en phosphate et en azote (P0 % et N0 %) n'impactent pas la capacité du colza à induire la germination des graines d'orobanche, alors que les carences en azote couplée au soufre (NS0 %) et en soufre seulement (S0 %) diminuent significativement la capacité d'induction d'environ 25 %. Au vu de ces résultats, l'hypothèse que la nutrition soufrée joue un rôle crucial dans l'aptitude du colza à stimuler la germination des graines du parasite peut être avancée.

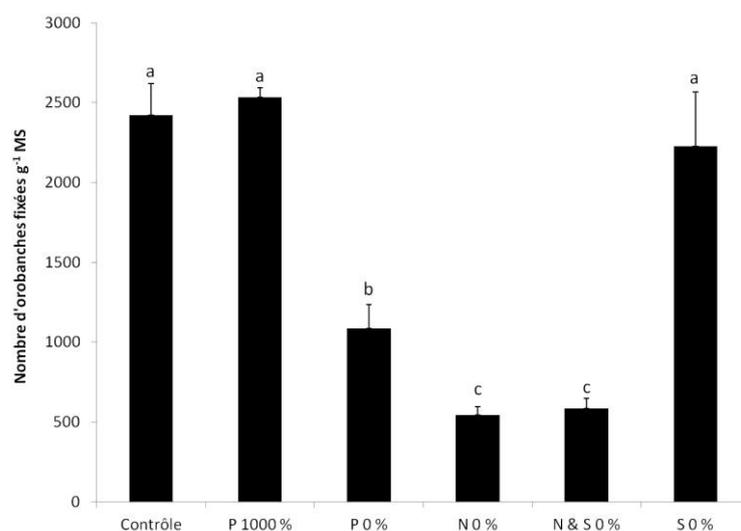


Figure 1.12 : de différents régimes de fertilisation sur la sensibilité du colza à l'orobanche rameuse (co-culture en mini-rhizotron ; moyenne ± SE, n = 12, ANOVA, * $P < 0,05$ versus contrôle TT, test SNK).

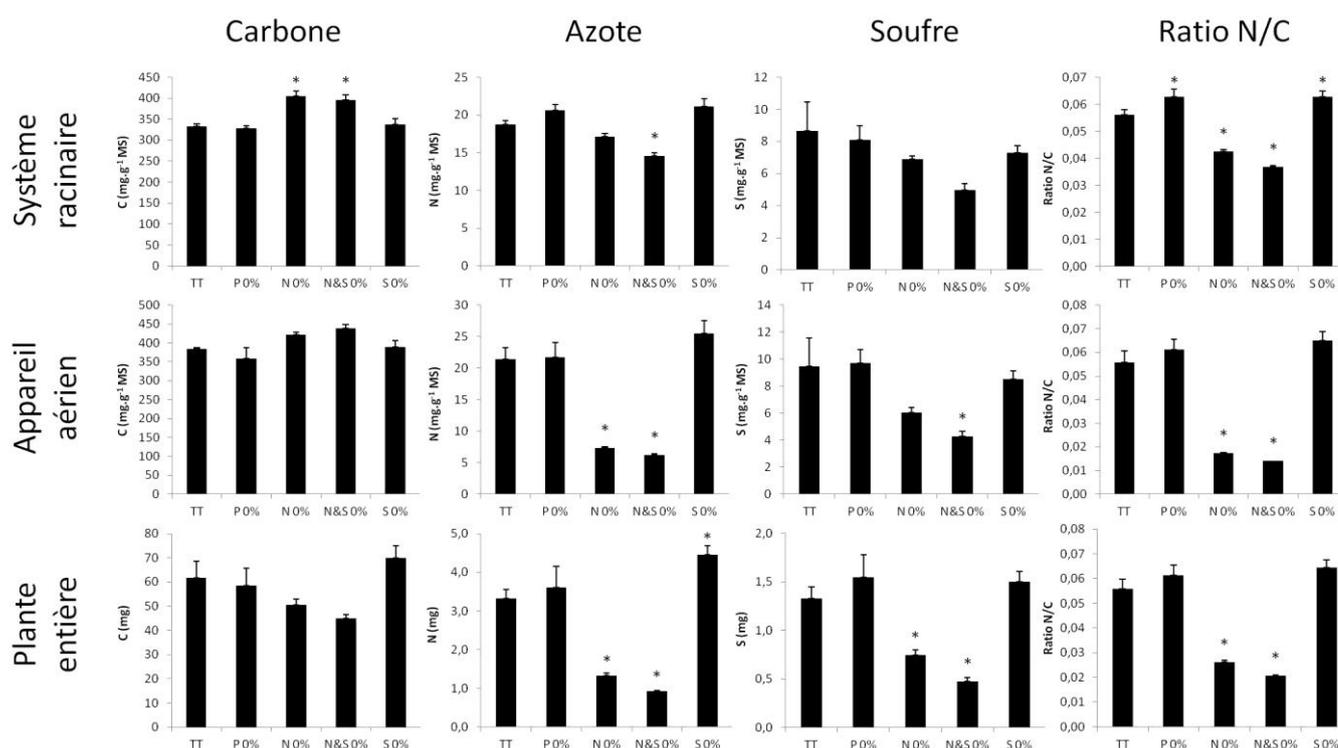


Figure 1.13 : Impact des différentes carences sur les teneurs en carbone, azote et soufre, et sur le ratio N/C du colza infesté par l'orobanche rameuse (co-culture en mini-rhizotron ; moyenne ± SE, n = 6, ANOVA, * $P < 0,05$ versus contrôle TT, méthode Holm-Sidak).

- **Impact des différents régimes de fertilisation sur la capacité de l'orobanche rameuse à se fixer au système racinaire du colza et sur la capacité du colza à soutenir le développement du parasite**

Le nombre d'orobanches fixées aux racines de colza, exprimé par gramme de matière sèche racinaire (g^{-1} MS), est également déterminé dans le système de mini-rhizotron en réponse aux différents régimes de fertilisation (**Fig. 1.12**). Le nombre d'orobanches fixées est inchangé sous un enrichissement en phosphate (P1000 %) et sous une carence en soufre (S0 %). Par contre, les carences en phosphate (P0 %) et en azote (N0 % et NS0 %) diminuent significativement le nombre d'orobanches fixées d'un facteur de 2 et 4 environ, respectivement. Ainsi, de façon très intéressante, une carence azotée (N0 %) ou phosphatée (P0 %) réduit significativement la sensibilité du colza à l'orobanche, et ce indépendamment de la phase d'induction de la germination des graines du parasite, qui n'est effectivement pas affectée par ces carences (**Fig. 1.11**). Le nombre d'orobanches fixées, de même que la biomasse totale des orobanches (**Fig. 1.10**), sont drastiquement réduits dans ces conditions. Par ailleurs, l'enrichissement du milieu en phosphate (P1000 %) est sans effet sur la capacité du colza à stimuler la germination des graines d'orobanche (**Fig. 1.11**), ainsi que sur la sensibilité du colza au parasite (**Fig. 1.12**), mais favorise par contre très nettement la prise de biomasse sèche des orobanches fixées, sans pour autant influencer significativement sur la biomasse du colza hôte (**Fig. 1.10**). A l'inverse, une carence en soufre (S0 %), bien qu'affectant significativement la capacité du colza à induire la germination des graines d'orobanche, n'impacte pas les paramètres de développement du parasite (nombre de fixations et biomasse).

Une étude plus approfondie de l'impact des contraintes nutritionnelles sur le statut en C, N et S et les profils de GLS racinaires a ensuite été réalisée.

- **Impact des différentes carences sur le statut en C, N et S du colza infesté**

Ces analyses élémentaires ont été réalisées sur le système racinaire et les parties aériennes de colzas infestés et cultivés en mini-rhizotron sous différents régimes de fertilisation (**Fig 1.13**). Seule une déficience en azote (N0 % et NS0 %) influence le statut carboné des plantes hôtes par un enrichissement significatif en C de la biomasse racinaire.

La carence azotée induit par contre une forte réduction de la teneur en azote, notamment dans les parties aériennes (≈ 70 %). En conséquence, les plants cultivés en condition de déficience en azote se caractérisent par une réduction de la biomasse (**Fig. 1.10**), un enrichissement en C des racines et une forte réduction de la teneur en azote, résultant en un ratio N/C réduit d'un facteur 3 dans les parties aériennes. A l'inverse, la carence en soufre provoque une légère augmentation de la quantité totale d'azote de la plante entière. On notera également que les carences en phosphate (P0 %) et en soufre (S0 %) augmentent significativement le ratio N/C dans le système racinaire des plantes hôtes.

La teneur en soufre des plants est plus faible que celles en C et N, d'un facteur 50 et 3 respectivement chez les témoins (fertilisation TT $\frac{1}{2}$). Il est à noter également une plus forte

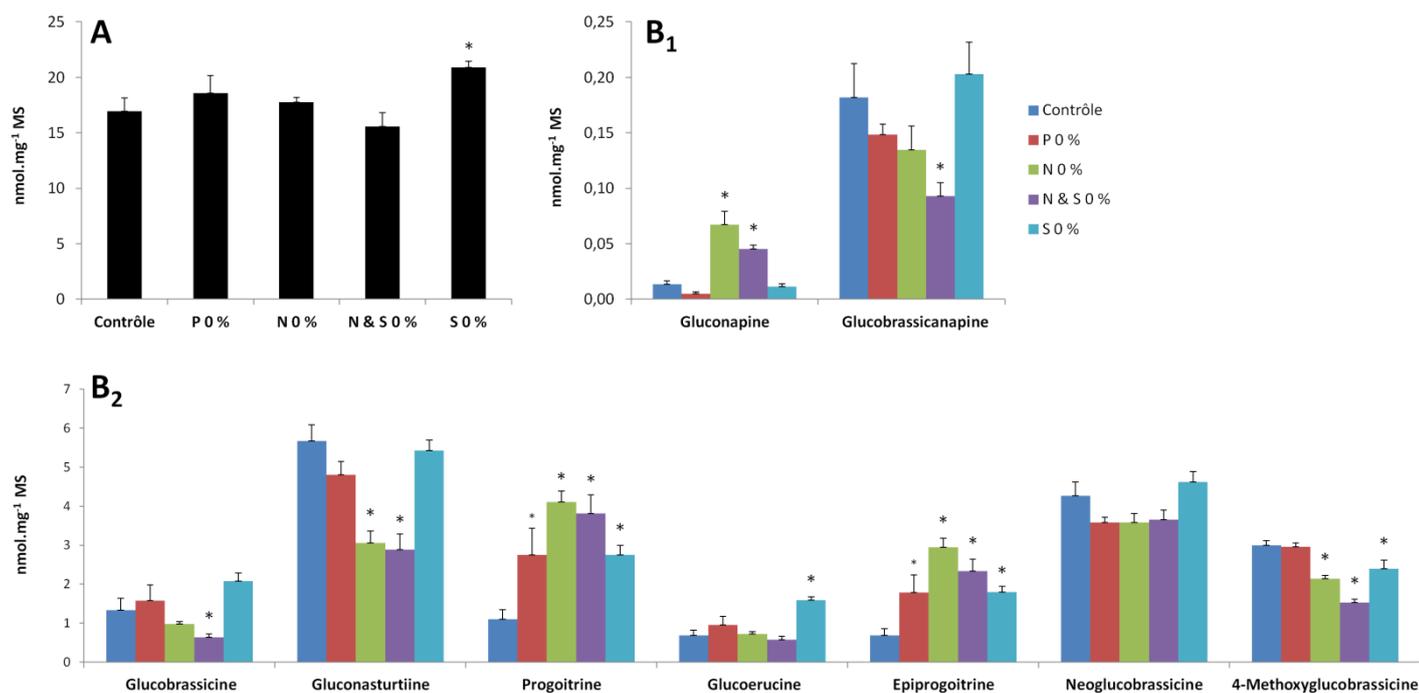


Figure 1.14 : Impact des différentes carences sur la teneur globale (A) et la composition en glucosinolates (B1 et B2) des racines du colza infesté par l'orbanche rameuse (co-culture en mini-rhizotron ; moyenne \pm SE, $n = 6$, ANOVA, * $P < 0,05$ versus contrôle TT, méthode Holm-Sidak ; A correspond à la somme des GLS présentés en B₁ et B₂).

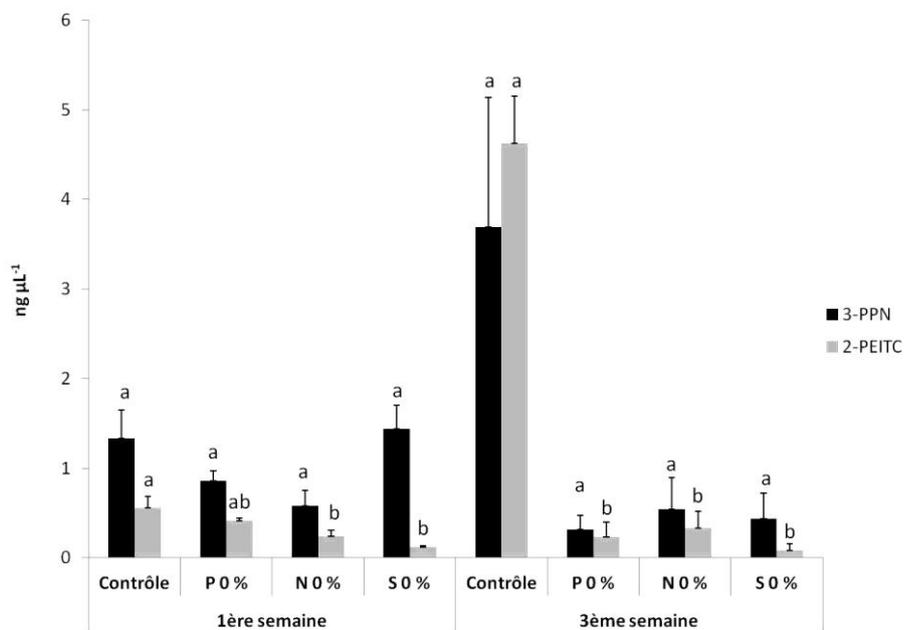


Figure 1.15 : Impact des différentes carences sur la cinétique d'exsudation des produits de dégradation de la gluconasturtiine par les racines de colza (culture en hydroponie ; moyenne \pm SE, $n = 3$, ANOVA, * $P < 0,05$, test SNK).

variabilité sur cet index chez les témoins par rapport aux statuts C et N, d'où l'absence de significativité de certains effets observés. Toutefois, il est intéressant de souligner qu'une carence en soufre (S0 %) est sans effet sur le statut global en soufre des plants de colza, à la différence d'une carence azotée (N0 %) et surtout d'une carence en azote couplée au soufre (NS0 %) qui diminuent considérablement (35 et 55 %, respectivement) la teneur en soufre des parties aériennes du colza et la quantité totale de soufre de la plante entière. Par contre, le statut soufré des racines est moins impacté par ces carences. La privation de soufre n'a donc pas permis de mettre en place une carence en soufre au sein des plantes, excepté additionnée d'une privation en azote.

- **Impact des différentes carences sur les profils des glucosinolates du système racinaire des colzas infestés et cultivés en mini-rhizotron**

Parmi les différentes carences testées en système de mini-rhizotron, seule la privation en soufre augmente significativement la teneur globale en GLS des racines de colzas infestés (**Fig. 1.14A**). L'effet des carences est néanmoins plus complexe sur les profils de GLS (**Fig. 1.14B₁ et B₂**). Il est possible de distinguer une réponse commune pour la progoitrine et l'épi-progoitrine dont les teneurs dans les racines augmentent en réponse à toutes les carences testées (P0 %, N0 %, NS0 % et S0 %). Aucune autre réponse significative n'est observée suite à une carence en phosphate (P0 %). Parallèlement, les carences en azote (N0 %) et en azote couplée au soufre (NS0 %) provoqueraient le même type de réponse physiologique, avec une diminution des teneurs en glucobrassicine, gluconasturtiine, 4-méthoxyglucobrassicine et glucobrassicinapine et une augmentation de la teneur en gluconapine. La carence en soufre ne se distingue des autres modalités testées que par l'induction d'une augmentation significative de la teneur en glucoérucine.

- **Impact des différentes carences sur la teneur des produits de dégradation des glucosinolates dans la rhizosphère de colza**

Comme l'ont précédemment démontré Auger et associés (Auger *et al.*, 2012), le 2-PEITC (stimulant de germination) et le 3-PPN (non-stimulant) sont les principaux composés issus de la dégradation des GLS exsudés dans la rhizosphère du colza, et plus particulièrement de la gluconasturtiine. Ce fut également le cas dans notre étude où les autres nitriles et ITCs n'ont été détectés qu'à l'état de traces dans les exsudats racinaires de colza. De ce fait, nous ne traiterons que du 2-PEITC et du 3-PPN dans cette partie analytique.

Les plants de colza ont été cultivés en hydroponie en condition de carence en phosphate (P0 %), azote (N0 %) et soufre (S0 %). La cinétique d'exsudation (**Fig. 1.15**) montre que le 2-PEITC et le 3-PPN sont quantifiables dans les exsudats racinaires concentrés des plants témoins et soumis aux trois types de carence pendant les trois semaines de culture. Cette cinétique met également en lumière une forte augmentation de la teneur des produits de dégradation de la

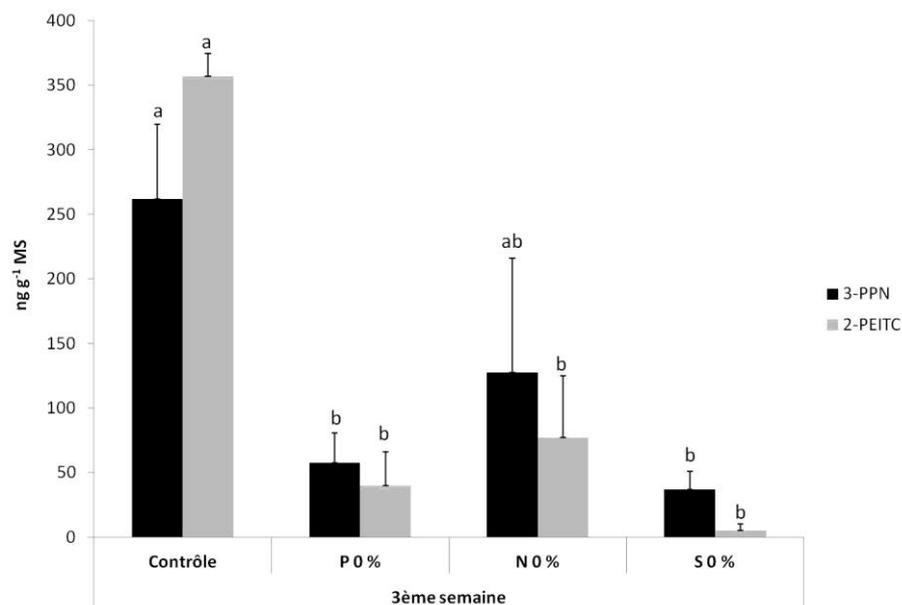


Figure 1.16 : Impact des différentes carences sur l'exsudation de produits de dégradation de la gluconasturtiine par les racines de colza (culture en hydroponie ; moyenne \pm SE, n = 3, ANOVA, * $P < 0,05$ versus contrôle TT, test SNK).

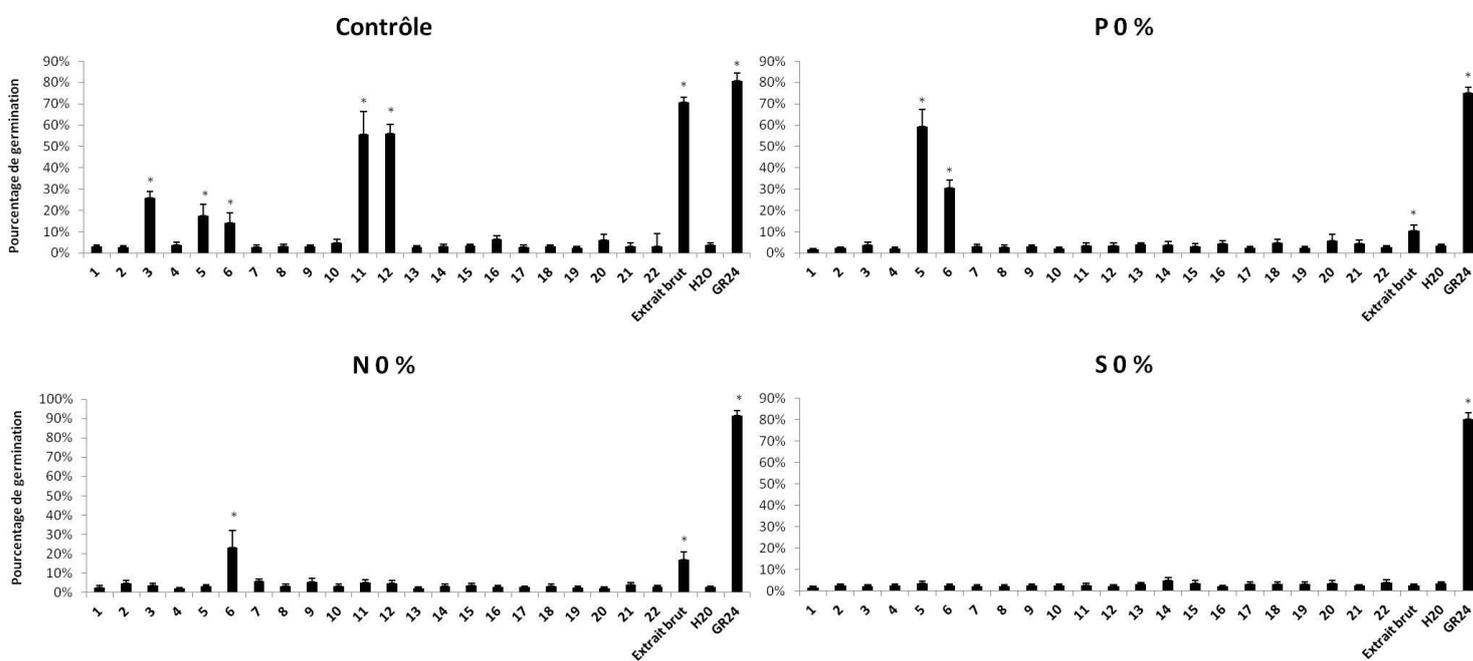


Figure 1.17 : Impact des différentes carences sur la capacité des extraits d'exsudats racinaires de colza fractionnés par RP-HPLC à induire la germination des graines d'orbanche rameuse (culture en hydroponie ; moyenne \pm SE, n = 9, ANOVA, * $P < 0,05$ versus contrôle H₂O + ACN, méthode Holm-Sidak).

gluconasturtiine exclusivement observée dans les exsudats racinaires des plants témoins entre une et trois semaines de culture (2,7 et 6,4 fois pour le 3-PPN et le 2-PEITC, respectivement).

Les carences azotée (N0 %) et phosphatée (P0 %) réduisent fortement la biomasse racinaire des plants de colza. Par contre, la carence en soufre est sans effet sur la biomasse racinaire des colzas cultivés en hydroponie (résultats non présentés). Seule la carence en phosphate (P0 %) diffère des réponses observées en mini-rhizotron. Par conséquent, exprimées en ng g^{-1} MS racinaire (**Fig. 1.16**), les teneurs en 3-PPN et 2-PEITC se révèlent nettement inférieures dans les exsudats des plants soumis aux carences en P, N et S que dans ceux des plants témoins. L'impact sur la teneur en 2-PEITC (stimulant de germination) est maximal pour la carence en soufre (S0 %).

- **Fractionnement RP-HPLC bio-guidé des exsudats racinaires des plants de colza cultivés en hydroponie**

Un fractionnement bio-guidé des exsudats racinaires concentrés a été effectué par RP-HPLC. L'activité des fractions collectées a été ensuite évaluée vis-à-vis de la germination des graines d'orobanche (**Fig. 1.17**). Ainsi, le fractionnement des exsudats racinaires des plants témoins montre trois zones distinctes du chromatogramme fortement inductrices de la germination des graines d'orobanche. Les fractions 11 et 12 sont de loin les plus actives. Par comparaison avec les temps de rétention de standards de stimulants connus (ITCs et SLs), plusieurs ITCs sont susceptibles d'être élués dans ces fractions, tels que le 2-PEITC majoritaire dans les exsudats racinaires du colza (Auger *et al.*, 2012), le 4-PITC, le benzyl-ITC et l'érucine, ainsi que certains SLs comme le sorgolactone et l'orobanchyl acétate. Les fractions actives 5 et 6 pourraient contenir des SLs plus polaires, tels que le 7-oxoorobanchyl acetate, l'orobanchol, le strigol et le 2-épi-orobanchol. Par contre, aucun des standards de stimulants testés n'est élué avec la fraction active 3.

Les exsudats racinaires concentrés des plants soumis aux différentes carences montrent tous un profil de stimulation simplifié et une activité stimulante globale fortement réduite (extrait brut) voire nulle pour la carence en soufre (S0 %). Suite à une carence en phosphate (P0 %), le fractionnement bio-guidé des exsudats racinaires concentrés ne révèle que deux fractions actives (n°5 et 6), et une seule (n°6) suite à la carence azotée. Une fois encore, la carence en soufre induit la réduction d'activité la plus drastique, aucune fraction active n'ayant pu être détectée.

3 Discussion

- **Place centrale du soufre et de l'azote dans l'interaction colza - orobanche rameuse**

Les expérimentations menées en système de mini-rhizotron et en hydroponie dans le cadre d'une fertilisation carencée montrent que la nutrition soufrée n'impacte pas l'interaction colza - orobanche mais contrôle l'étape de stimulation de la germination des graines du parasite par les exsudats racinaires de l'hôte (**Fig. 1.11 et 1.17**). Ces résultats s'accordent avec le fait que le 2-PEITC est l'ITC majoritaire dans la rhizosphère du colza (Kirkegaard and Sarwar, 1998) et qu'Auger et associés ont récemment démontré le rôle prédominant de ce composé soufré en tant que stimulant de germination des graines de l'orobanche rameuse dans cette interaction (Auger *et al.*, 2012). Dans ce contexte, l'analyse approfondie de l'impact d'une fertilisation carencée en soufre sur le statut global du colza en C, N et S, sur les teneurs en GLS des racines, mais également sur les stimulants de germination exsudés dans la rhizosphère apporte des informations intéressantes sur les mécanismes du contrôle de l'interaction par le soufre.

En premier lieu, une fertilisation carencée en soufre (S0 %) est sans effet sur le statut soufré du colza après 4 semaines de co-culture avec l'orobanche en système de mini-rhizotron, et ce à la fois dans les racines et les feuilles (**Fig. 1.13**). Dans nos conditions expérimentales, la privation en soufre n'a pas permis d'obtenir des plants carencés en soufre. Ainsi, l'élément soufre, même suite à une fertilisation fortement carencée (S0 % : diminution de 97 % de l'apport) en mini-rhizotron pendant 4 semaines, ou en hydroponie pendant 3 semaines, n'est pas limitant pour le développement du colza (**Fig. 1.1 et 1.10**). En effet, les symptômes phénotypiques de la carence en soufre chez les plantes, tels que l'augmentation du nombre et de la taille des racines latérales, la diminution de la biomasse aérienne, la chlorose foliaire, la déformation "en cuillère" des feuilles ou l'accumulation d'anthocyanes dans les feuilles n'ont pas été observés dans ces conditions de culture et pour ces durées d'expérimentation (Schnug and Haneklaus ; Blake-Kalff *et al.*, 1998 ; Kutz *et al.*, 2002 ; Lewandowska and Sirko, 2008 ; Franzaring *et al.*, 2011 ; D'Hooghe *et al.*, 2013). Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que la quantité de soufre initialement stockée dans les cotylédons (en sénescence entre 3 et 4 semaines en système de mini-rhizotron), sous forme de protéines (napine et cruciférine) et de GLS principalement, et correspondant à 1,1 - 1,7 % de soufre par gramme de matière sèche séminale (Höglund *et al.*, 1992 ; Zhao *et al.*, 1993 ; Asare and Scarisbrick, 1995 ; Falk *et al.*, 2007 ; Nesi *et al.*, 2008), suffit au développement du colza (remobilisation) dans nos conditions de culture en mini-rhizotron (McGregor, 1988 ; Barciszewski *et al.*, 2000 ; Petersen *et al.*, 2002). Toutefois, cela n'exclut pas l'hypothèse que la très faible quantité de soufre fournie et la fixation du soufre atmosphérique puisse également jouer un rôle dans ces conditions.

Par contre, une fertilisation carencée en azote (N0 %), et de façon encore plus marquée en azote couplée au soufre (NS0 %), impacte négativement la teneur en soufre des racines mais surtout des feuilles du colza (**Fig. 1.13**). Ce résultat traduit l'interaction entre la nutrition azotée et la nutrition soufrée, avec la connaissance chez les plantes d'un contrôle par l'azote de l'assimilation du soufre (Koprivova *et al.*, 2000 ; Kopriva and Rennenberg, 2004 ; Loudet *et al.*, 2007), mais surtout d'une remobilisation des réserves soufrées des feuilles cotylédonaires

(sulfate, aminoacides soufrés, GLS, glutathion...) (Fismes *et al.*, 2000 ; Dubousset *et al.*, 2009 ; Abdallah *et al.*, 2010, 2011). Les résultats obtenus suggèrent que la fertilisation carencée en azote (N0 %), induisant une carence des plants en azote, perturbe la remobilisation précoce du soufre des feuilles cotylédonaire (faible efficacité d'utilisation du soufre, SUE) ou l'assimilation de la faible quantité de soufre présente dans le milieu de culture carencé. Plusieurs marqueurs impliqués dans la nutrition soufrée et affectés par une carence azotée devront faire l'objet d'études ultérieures pour tenter de valider cette hypothèse, comme des aminoacides et petits-peptides impliqués dans la transduction du signal de déficience en soufre (*O*-acetyl serine, glutathion ; Kim *et al.*, 1999 ; Lappartient *et al.*, 1999 ; Kutz *et al.*, 2002 ; Kopriva and Rennenberg, 2004 ; Lewandowska and Sirko, 2008 ; Kaur *et al.*, 2010) et des gènes codant pour les transporteurs de sulfate (*BnSultr4.1* et *BnSultr4.2*) impliqués dans la remobilisation du soufre foliaire du colza (Dubousset *et al.*, 2009). De ce fait, la confrontation de mutants affectés dans l'assimilation ou la remobilisation du soufre (*B. napus*, *A. thaliana*) vis-à-vis de l'orobanche est une perspective majeure de ces travaux.

L'originalité de l'interaction colza - orobanche rameuse vient donc en partie du fait que la plante parasite détourne les GLS et leurs produits de dégradation (ITCs), synthétisés et exsudés dans un but de défense face aux organismes édaphiques en une "molécule signal" de la présence d'un hôte potentiel. Ce type de détournement n'est certes pas unique dans le cas du colza, puisqu'un phytopathogène fongique, *Plasmodiophora brassicae*, parvient à utiliser à son profit certains GLS indoliques comme sources d'auxine (AIA ; Ludwig-Müller, 2008). Cela reste néanmoins relativement original comparé aux diverses plantes parasites sensibles à la signalétique symbiotique médiée par les SLs.

- **Fertilisation carencée en soufre et remobilisation des glucosinolates**

Des différents régimes de fertilisation réalisés en système de mini-rhizotron, seul le régime carencé en soufre (S0 %) augmente significativement le taux global de GLS racinaires du colza. La stimulation par la restriction en soufre de la remobilisation vers les racines de molécules soufrées issues des feuilles ayant été démontrée au stade rosette (Abdallah *et al.*, 2010; Dubousset *et al.*, 2010), l'hypothèse que les GLS issus des feuilles cotylédonaire en premier lieu puis des autres feuilles puisse y jouer un rôle important peut être avancée (Smetanska, 2005). En effet, plusieurs études discutent cette remobilisation foliaire des GLS comme non seulement un système de défense des racines contre les pathogènes, la plante étant plus sensible à ces pathogènes suite à une longue carence en soufre, mais aussi comme une réponse à la demande en soufre du métabolisme primaire nécessaire au maintien de la croissance racinaire. Dans ces conditions, les GLS cotylédonaire, normalement peu remobilisés (Petersen *et al.*, 2002), deviennent une source potentielle de soufre, d'azote et d'AIA (Kutz *et al.*, 2002 ; Maruyama-Nakashita, 2003 ; Hirai *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2011 ; D'Hooghe *et al.*, 2013). Un réseau de contrôle basé sur l'équilibre JA/GLS/AIA régulerait ainsi la réponse à la déficience en soufre (Nikiforova *et al.*, 2003), notamment par l'induction d'une surexpression de gènes impliqués dans le catabolisme des GLS et codant pour des thioglucosidases (myrosinases) et des nitrilases (Kutz *et al.*, 2002 ; Maruyama-Nakashita, 2003 ; Maruyama-Nakashita *et al.*, 2006). Pour valider cette hypothèse chez le colza infesté, en condition de fertilisation carencée

en soufre, il conviendra donc, dans des études ultérieures, d'approfondir l'analyse des GLS à l'échelle de la plante entière (cotylédons, feuilles et racines) et de suivre l'expression de ces gènes marqueurs de la remobilisation des GLS et de leur métabolisme dans les racines, ainsi que l'implication de transporteurs de GLS (Nour-Eldin *et al.*, 2012). Dans l'interaction colza - orobanche, le parasite est très probablement le puits principal des molécules remobilisées. Il serait donc important d'évaluer aussi l'impact de ces régimes de fertilisation contrastés, sur l'accumulation et le profil des GLS des tubercules d'orobanche.

- **Fertilisation, taux et profil des glucosinolates racinaires et contenu de la rhizosphère en 2-PEITC : une situation complexe**

Dans notre étude, une fertilisation carencée en soufre est sans effet sur le taux de soufre des racines de colza (**Fig. 1.13**), mais s'accompagne d'une diminution de la capacité des racines à induire la germination des graines d'orobanche (**Fig. 1.11**), et ce en concordance avec une réduction forte du contenu de la rhizosphère en produits de dégradation des GLS, dont le 2-PEITC, le stimulant de germination prépondérant du colza (**Fig. 1.16**). Notons que l'analyse de la composition en GLS des exsudats racinaires (Plate-forme HRMS, ICOA, Université d'Orléans) s'est avérée non-concluante en raison de teneurs trop faibles en GLS et trop élevées en sels (issus du milieu de culture). Il ne nous a donc pas été possible d'identifier les principaux GLS exsudés dans notre système. Notre étude souligne aussi l'absence d'une corrélation simple entre la teneur en 2-PEITC de la rhizosphère (**Fig. 1.16**) et celle en gluconasturtiine des racines, principal GLS à l'origine du 2-PEITC (**Fig. 1.14** ; van Dam *et al.*, 2008). En effet, la teneur en gluconasturtiine est inchangée dans les racines de colza soumis à une carence en phosphate ou en soufre (P0 % et S0 %) alors que ces conditions de culture impactent négativement le taux de 2-PEITC de la rhizosphère. Par contre, dans le cas d'une carence azotée (N0 %), une réduction concomitante des contenus en gluconasturtiine des racines et en 2-PEITC de la rhizosphère est observée (**Fig. 1.14 et 1.16**). Le contrôle par le colza de la teneur de la rhizosphère en 2-PEITC s'avère donc complexe, faisant notamment intervenir les mécanismes d'exsudation racinaire des GLS, dont la régulation est inconnue à ce jour. Il est tout à fait envisageable qu'en condition de fertilisation carencée en soufre, le colza limite les pertes de soufre liées à l'exsudation racinaire. À ce titre, la charge phloémienne des GLS fait intervenir un processus de transport actif (Chen *et al.*, 2001). Récemment, Nour-Eldin et collaborateurs ont identifié et caractérisé chez *A. thaliana* deux transporteurs plasmalemmiques de type NRT/PRT, GTR1 et GTR2, actifs dans la charge phloémienne lors de la remobilisation des GLS des feuilles sources et des parois des siliques dans les graines (Nour-Eldin *et al.*, 2012). Il conviendra ainsi, dans des études ultérieures, de considérer l'implication de ce type de transporteurs dans l'interaction colza - orobanche, à l'instar du transporteur de SLs (ABC transporter PDR1) récemment identifié chez *Petunia hybrida* et *A. thaliana* comme un transporteur impliqué dans l'exsudation racinaire de ces composés et de ce fait dans la symbiose mycorhizienne (Kretschmar *et al.*, 2012). De même, l'exsudation racinaire des GLS étant sous contrôle du méthyl jasmonate (MeJA) et du salicylate (Schreiner *et al.*, 2011), et sachant qu'une déficience en soufre régule l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans la biosynthèse du JA (Hirai *et al.*, 2003 ; Nikiforova *et al.*, 2003 ; Maruyama-Nakashita, 2003), l'hypothèse qu'une carence en soufre puisse impacter la

biosynthèse ou la translocation de ces phytohormones dans les racines et induire une inhibition de l'exsudation des GLS peut être posée.

Il est nécessaire de prendre également en compte l'implication de la flore microbienne (activité myrosinase) de la rhizosphère dans la production d'ITCs à partir des GLS exsudés. Il a été ainsi démontré que la composition en GLS de la rhizosphère impacte la communauté bactérienne et fongique de la rhizosphère du colza et d'*A. thaliana* (Rumberger and Marschner, 2003, 2004 ; Bressan *et al.*, 2009). Il est donc tout à fait envisageable qu'une carence en soufre puisse la moduler également par l'intermédiaire des GLS ou d'autres molécules exsudées servant potentiellement de substrat aux microorganismes du sol. De même, la nature des molécules exsudées par les racines est variable selon les conditions de culture et influence ainsi le pH de la rhizosphère. Par exemple, en condition de carence en phosphate, le colza exsude plus intensément des acides organiques qui acidifient le sol et contribuent ainsi à une meilleure solubilité du phosphate inorganique (Hoffland *et al.*, 1992 ; Zhang *et al.*, 1997; Ligaba *et al.*, 2004 ; Jaitz *et al.*, 2010 ; Mimmo *et al.*, 2011). Or, l'activité myrosinase est médiée par le pH de la rhizosphère : les pH acides (pH 2 - 5), neutres (pH 5 - 8) et basiques (pH > 8) sont propices à la production de nitriles (non stimulants) en présence de Fe²⁺, d'ITCs (stimulants) et de thiocyanates (non stimulants), respectivement. Dans notre étude (mini-rhizotron), le milieu de culture étant faiblement tamponné (MES 1 mM), l'hypothèse d'une variation du pH de la rhizosphère en réponse aux régimes de fertilisation contrastés ne peut être exclue. Ce point pourra être facilement vérifié dans de prochaines études.

- **Fertilisation et spectre des stimulants de germination dans la rhizosphère du colza**

L'analyse des différents profils de fractionnement des exsudats racinaires concentrés ouvrent également de nouveaux horizons. En effet, ces analyses montrent que les fertilisations carencées en phosphate et en azote (P0 % et N0 %) induisent une nette inhibition de l'activité stimulatrice des fractions 11 et 12, contenant le 2-PEITC, tout en augmentant celle des fractions 5 ou 6, contenant vraisemblablement des SLs non identifiés (**Fig. 1.17**). Ces SLs sont actuellement en cours de caractérisation par l'équipe partenaire du professeur Yoneyama (Weed Science Center, Utsunomiya University, Japon). Ces carences semblent donc, d'une part, diminuer considérablement la quantité de 2-PEITC dans la rhizosphère jusqu'à un seuil limite où, après fractionnement (et donc dilution), les fractions 11 et 12 ne sont plus actives, et d'autre part induire une augmentation de l'exsudation de SLs polaires. Ces modifications du profil d'exsudation racinaire expliqueraient le maintien d'une bonne capacité des racines à induire la germination des graines d'orobanche en système de mini-rhizotron, en condition de régimes carencés en azote (N0 %) et en phosphate (P0 % ; **Fig. 1.11**). À ce titre, de nombreux travaux ont déjà reporté chez d'autres plantes l'effet bénéfique d'une fertilisation carencée en phosphate ou en azote sur la synthèse ou l'exsudation des SLs (Yoneyama *et al.*, 2001, 2007b,a, 2012 ; Ayongwa *et al.*, 2006). Ainsi chez le colza, l'impact de la fertilisation sur la capacité à exsuder des stimulants de germination se révèle plus complexe que la simple présence ou absence du 2-PEITC et ferait intervenir des molécules spécifiquement exsudées en réponse à telle ou telle carence.

Dans ce contexte, se pose aussi la question de l'impact d'une fertilisation carencée en soufre, puisque cette dernière tend à induire une réduction drastique de la quantité de 2-PEITC dans la rhizosphère, d'où l'inactivité des fractions 11 et 12, sans conserver non plus une quelconque activité résiduelle dans les fractions 5 et 6 (**Fig. 1.16 et 1.17**). Ces résultats ne concordent pas avec l'activité stimulatrice du colza en système de mini-rhizotron, en condition de régime carencé en soufre (S0 % ; **Fig. 1.11**). Les exsudats racinaires concentrés ne correspondent donc que partiellement aux conditions de la rhizosphère (concentration, pH...) mais s'avèrent être l'outil disponible pour l'identification ou la quantification des composés exsudés présentant une activité de stimulation de la germination des graines d'orobanche.

- **Fertilisation et sensibilité du colza à l'orobanche**

Suite à la phase de stimulation nécessaire à la germination des plantes parasites, intervient un certain nombre de processus sans lesquels la fixation du parasite au système racinaire de son hôte et la formation d'un continuum vasculaire obligatoire à la survie du parasite seraient impossibles. Le contrôle de ces étapes clefs du processus infectieux est encore méconnu. Notre étude apporte des informations intéressantes à ce sujet, en ouvrant le débat sur le contrôle par la fertilisation du "succès d'installation" du parasite sur les racines de l'hôte.

En premier lieu, nos expérimentations de fertilisation contrastée en système de mini-rhizotron, montrent que des régimes carencés en phosphate (P0 %) ou en azote (N0 %) sont sans effet sur la capacité du colza à induire la germination des graines du parasite, mais perturbent très significativement l'initiation de la phase de développement parasitaire de l'orobanche, comme le montre le nombre limité d'orobanches fixées (g^{-1} MS racinaire) dans ces conditions de fertilisation (**Fig. 1.11 et 1.12**). Plusieurs travaux reportent l'effet inducteur d'une faible disponibilité de l'azote ou du phosphate sur la signalisation et l'accumulation du JA (Chen *et al.*, 2008 ; Chacón-López *et al.*, 2011). Sachant que la défense des plantes (dont *A. thaliana*, *M. truncatula*, *H. annuus* et *L. japonicus*) à l'orobanche (*P. ramosa*, *O. crenata*, *O. cumana* et *P. aegyptiaca* respectivement) est médiée par le JA (Vieira Dos Santos *et al.*, 2003b,a ; Die *et al.*, 2007 ; Letousey *et al.*, 2007 ; Hiraoka *et al.*, 2009), l'hypothèse que de telles conditions réduisent la sensibilité du colza à l'orobanche par un renforcement des mécanismes de défense JA-dépendants est séduisante. Des études ultérieures en conditions de fertilisation contrastée devront être menées avec des mutants (*A. thaliana* et colza si disponibles) dans la production ou la signalisation du JA pour évaluer cette hypothèse.

- **Fertilisation et aptitude du colza à soutenir le développement des orobanches en post-fixation**

Un régime carencé en azote (N0 %) réduit très nettement la biomasse sèche globale des orobanches fixées (**Fig. 1.10**). Cet effet s'explique en partie par la moindre sensibilité du colza (nombre limité d'orobanches fixées ; **Fig. 1.12**), mais aussi très probablement par une carence nutritionnelle en raison d'une moindre disponibilité des photoassimilats du colza dont le développement est également impacté dans ces conditions de fertilisation (**Fig. 1.10**).

L'effet néfaste d'un régime carencé en phosphate (P0 %) sur la biomasse sèche globale des orobanches est de plus faible amplitude. En effet, dans ces conditions, le nombre d'orobanches fixées est plus élevé qu'en condition de fertilisation carencée en azote, et le développement du colza n'est pas impacté (**Fig. 1.10**). Ainsi, dans nos expérimentations, la carence en phosphate ne semble pas influencer sur l'aptitude du colza à soutenir la croissance des orobanches fixées.

En parallèle, notre étude montre qu'un enrichissement du milieu de culture en phosphate (P1000 %) favorise la prise de biomasse sèche des orobanches en post-fixation (**Fig. 1.10**). Le développement des tubercules d'orobanche s'avère donc ainsi phosphate-dépendant. Il serait intéressant d'étudier dans ces conditions la redistribution du phosphate dans l'interaction colza - orobanche, afin d'évaluer l'hypothèse d'un contrôle direct de la force de puits du parasite par le phosphate, Brotherson et associés (2005) ayant montré que *O. fasciculata* accumulait plus de phosphate que son hôte. Le développement des tubercules repose essentiellement sur l'utilisation du saccharose prélevé chez l'hôte (Aber *et al.*, 1983 ; Abbes *et al.*, 2009b ; Draie *et al.*, 2011 ; Péron *et al.*, 2012) qui résulte dans une forte accumulation d'hexoses, de mannitol mais aussi d'amidon (Harloff and Wegmann, 1993; Delavault *et al.*, 2002; Abbes *et al.*, 2009a). Sachant que la dégradation de l'amidon est dépendante de la phosphorylation des glucanes de la couche externe des granules (Lloyd *et al.*, 2005 ; Fettke *et al.*, 2007 ; Zeeman *et al.*, 2010 ; Kötting *et al.*, 2010), il serait intéressant d'étudier les modifications métabolomiques engendrées dans les tubercules d'orobanche par une fertilisation enrichie en phosphate, notamment celles contribuant à un accroissement de la force de puits du parasite, comme par exemple la libération de composés osmotiquement actifs par la dégradation de l'amidon.

**Chapitre 2 : Absorption, translocation et flux
d'azote dans l'interaction *Brassica napus* /
*Phelipanche ramosa***

1 Matériels et méthodes

1.1 Matériel végétal

- ***Phelipanche ramosa* (L.) Pomel**

Les graines d'orobanche rameuse sont issues de hampes florales matures collectées en 2005 sur la commune de Saint Martin de Fraigneau (Vendée, France), au sein d'une parcelle de colza d'hiver naturellement infestée (type génétique 1). Elles ont été conservées à l'obscurité à 25 °C.

- ***Brassica napus* L.**

Les variétés de colza ES Alienor et Shakira (variété double zéro) ont été choisies dans cette étude pour leurs comportements contrastés face à l'orobanche, le génotype ES Alienor faisant office de témoin sensible comparé au génotype Shakira qui présente un comportement moins favorable au développement post-fixation du parasite (Gauthier *et al.*, 2012b). Les graines de ces génotypes ont été gracieusement fournies par les compagnies Euralis-semences (Lescar, France) et Maïsadour-semences (Mont de Marsan, France), respectivement.

- **Campagnes d'échantillonnage en champ**

Deux campagnes d'échantillonnage en champ ont été réalisées sur la commune de Saint Martin de Fraigneau (Vendée, France), au sein de deux parcelles de colza d'hiver contigües et naturellement infestées (Latitude 46.430778, Longitude -0.740281 ; parcelles essais de Maïsadour-Semences), sur les périodes de novembre 2009 à mai 2010, puis décembre 2010 à mai 2011. Chaque année, quatre dates de récolte ont été fixées en fonction des conditions climatiques et du stade de développement du colza (avant vernalisation, stades B ; à la reprise de la croissance végétative, stades C ; durant la floraison, stades F-G1 ; durant la fructification, stades G3-G5). Dix répétitions biologiques (système racinaire du colza + orobanches fixées) ont été récoltées autour de 8 fanions répartis sur l'ensemble de la parcelle, chaque fanion correspondant à une ligne du génotype Shakira jouxtant une ligne du témoin sensible ES Alienor de façon à pouvoir discriminer toute hétérogénéité d'infestation de la parcelle. Les orobanches fixées par plant de colza ont été dénombrées et classées en fonction de leur stade de développement. Les masses sèches (80 °C, 3 jours) ont été mesurées pour chaque système racinaire de colza et ses orobanches associées.

Tableau 2.1 : Composition des milieux de culture Liquoplant Bleu et FD 134 Hiver

Teneurs exprimées en P/V (Kg/100 L)

Macroéléments	Bleu	FD 134 Hiver	Microéléments	Bleu	FD 134 Hiver
NO₃	1,50	1,44	Fe-EDDHA	0,0250	0,0400
NH₄NO₃	1,00		B	0,0050	0,0040
P₂O₅	5,00	2,56	Cu	0,0013	0,0010
K₂O	2,50	6,40	Mn	0,0270	0,0210
MgO	0,75	1,60	Mo	0,0005	0,0004
SO₃		3,60	Zn	0,0070	0,0056

- **Co-culture en pots de l'association *Brassica napus* - *Phelipanche ramosa***

Le conditionnement des graines d'orobanche (5 mg par pot) est réalisé en serre (18 °C ± 5 °C, 7 jours) dans des Jiffy™ pots de 0,4 L contenant un mélange tamisé de terre, tourbe et sable (1/1/1), préalablement humidifiés et recouverts d'une bâche plastique noire (maintien de l'humidité constante).

Les graines de colza sont ensuite semées dans ces mêmes Jiffy™ pots, à raison de trois graines par pot, la plus vigoureuse des trois jeunes plantes étant conservée après germination. Les cultures sont maintenues en serre pendant six semaines (18 °C ± 5 °C, héméropériode de 16h, 300 µmol PAR m⁻² s⁻¹) durant lesquelles l'apport d'engrais est effectué une fois par semaine à raison de 100 mL de Liquoplant™ Bleu 3 ‰ par pot (**Tab. 2.1**). Les jeunes plants de colza sont ensuite transférés en chambre de vernalisation durant 8 semaines (3 jours, 15 °C → 4 °C puis 4 °C ± 1 °C, héméropériode de 16h, 100 µmol PAR m⁻² s⁻¹) durant lesquelles la fertilisation est maintenue. Suite à une rehausse graduelle de la température (3 jours, 4 °C → 15 °C) mettant un terme à la période de vernalisation, les Jiffy™ pots sont placés au centre de pots de 2 L contenant le même mélange terre, tourbe et sable puis transférés en serre. La reprise de croissance des plantes est accompagnée d'une augmentation de la fertilisation à raison de 300 mL de Liquoplant™ FD 134 Hiver 3 ‰ par pot (**Tab. 2.1**), deux fois par semaine. La fertilisation totale correspond, après calcul, à une dose proche de 250 kg N ha⁻¹.

L'impact du parasitisme sur le développement de l'hôte est évalué par comparaison avec des plants de colzas non-parasités, cultivés dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus.

- **Phénotypage de l'interaction**

Dénombrement des différents stades de développement de l'orobanche rameuse

A chaque date de récolte, les plants sont soigneusement dépotés et leurs systèmes racinaires rincés à l'eau puis analysés sous loupe binoculaire (Olympus, SZX10). Les orobanches fixées sont dénombrées par plant et classées selon leur stade de développement (d'après Labrousse *et al.*, 2001 ; **Fig. 38**).

Stade 1 : Fixation de l'orobanche à la racine hôte (mise en place de l'haustorium)

Stade 2 : Formation du tubercule à l'extérieur de la racine hôte

Stade 3 : Apparition de racines adventives sur le tubercule (stade Spider)

Stade 4 : Formation de la tige souterraine à partir d'un méristème caulinaire

Stade 5 : Orobanche émergée et en floraison (inflorescence)

Stade 6 : Orobanche émergée et en fructification (fleurs fanées)

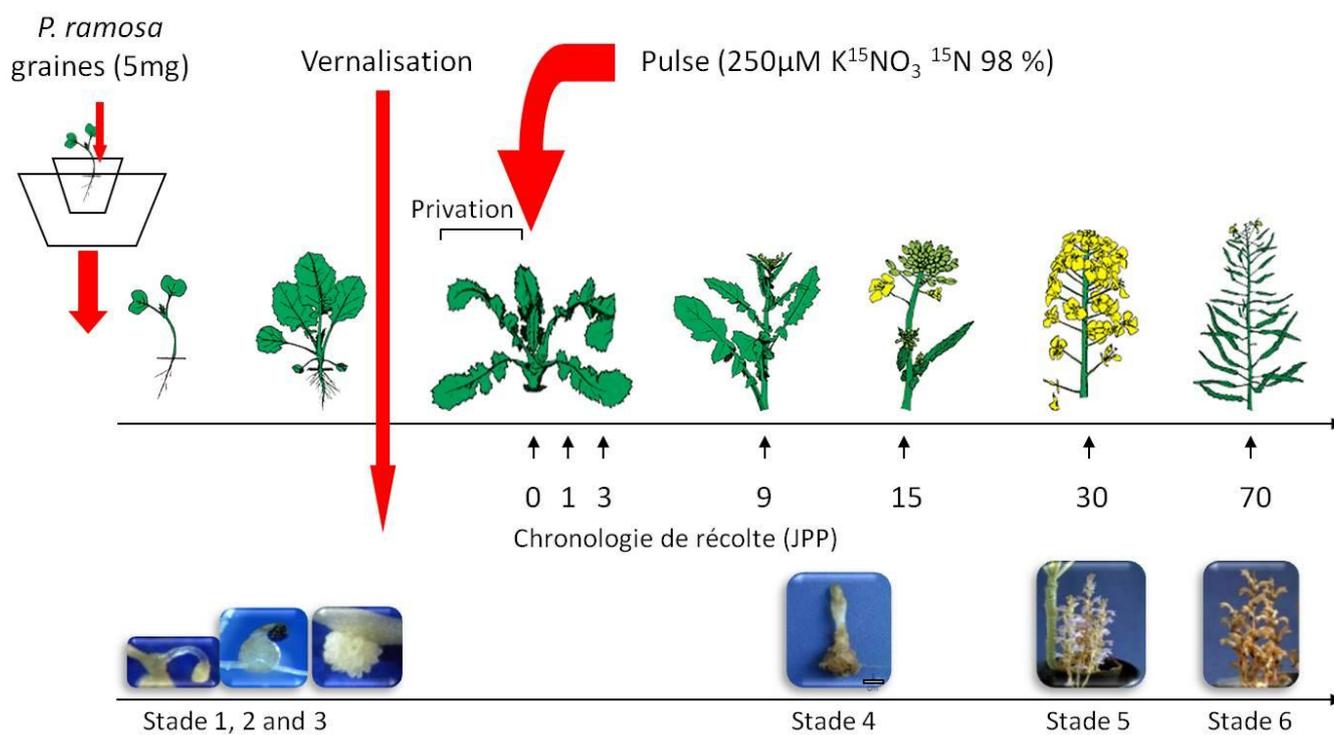


Figure 2.1 : Co-culture en serre de l'interaction colza - orobanche rameuse alimentées en K^{15}NO_3 (250 μM , enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de LiquoplantTM FD 134 Hiver 3 %. Chronologie de récolte, jpp : jours post-pulse.

- **Marquage au $K^{15}NO_3$ des plants de colza parasités et non-parasités**

Dix jours après la sortie de vernalisation, un lessivage partiel améliorant l'absorption ultérieure des nitrates marqués est effectué par apport de 200 mL d'eau distillée (**Fig. 2.1**). La fourniture unique de ^{15}N (pulse) est réalisée 3 jours plus tard par un apport de 200 mL par plant d'une solution de $K^{15}NO_3$ 250 μM (enrichie à 98% en ^{15}N , Euriso-top, France). Une chasse du $^{15}NO_3^-$ non-absorbé est effectuée deux jours plus tard par la reprise du rythme de fertilisation. Les plantes sont récoltées à $t = 0$ (avant l'apport de ^{15}N) puis 1, 3, 9, 15, 30 et 70 jours après l'apport de ^{15}N (jours post-pulse, jpp) suivant une cinétique ciblée sur les étapes clés du développement du colza. Les différents compartiments de l'interaction sont séchés à l'étuve (80 °C, 3 jours) immédiatement après récolte : tubercule et tige de l'orobanche ; système racinaire, hypocotyle, tige comprenant les inflorescences, feuilles en place, siliques et feuilles sénescentes récupérées après leur chute.

Trois répétitions biologiques sont réalisées par date de prélèvement ($n = 3$), et ce pour les deux répétitions de l'expérimentation qui ont eu lieu à 12 mois d'intervalle. En parallèle, des plants ayant reçus un pulse de 200 mL de $K^{14}NO_3$ 250 μM servent de témoins (abondance naturelle en isotopes lourds), afin de discriminer précisément le ^{15}N issu du pulse du ^{15}N provenant de la fertilisation.

Les masses sèches des différents compartiments de l'interaction sont mesurées après 3 jours d'étuve à 80 °C. Le matériel végétal sec est réduit en poudre homogène (environ 10 μm) à l'aide d'un vibro-broyeur à bols (Retsh, Hann, Allemagne) et stocké à température ambiante, à l'abri de la lumière, dans des tubes hermétiquement fermés, avant analyses SMRI.

1.2 Analyse par spectrométrie de masse de rapport isotopique (SMRI)

- **Préparation des échantillons**

Les échantillons sont pesés à l'aide d'une balance de précision 10^{-5} g (Mettler Toledo, XP6 Ultra-microbalance, Columbus, Ohio, USA), chaque type d'organe nécessitant une pesée précise (**Tab. 2.1**). L'analyse SMRI nécessite au préalable l'encapsulation des échantillons dans des capsules en étain (tin capsules for solids "light" 4x6 mm, 250 pcs, Thermo Fisher Scientific, Brême, Allemagne). Deux répétitions techniques sont systématiquement réalisées consécutivement, la différence obtenue entre les deux capsules d'un même échantillon devant être inférieure ou égale à 2 % de la valeur moyenne pour que l'échantillon soit considéré comme homogène.

- **Appareillage d'analyse**

Les teneurs en carbone et azote ainsi que les compositions isotopiques (ou δ values) $\delta^{15}N$ et $\delta^{13}C$ des poudres sont déterminées à l'aide d'un Spectromètre de Masse de Rapports Isotopiques (SMRI ; IRMS Delta V Advantage, Thermo Fisher Scientific, Brême, Allemagne) couplé

à un analyseur élémentaire (AE ; Flash EA 1112HT, Thermo Fisher Scientific) via une interface conflo (Finnigan Conflo III, Thermo Fisher Scientific ; laboratoire CEISAM, Université de Nantes). La combustion et la réduction des échantillons sont assurées par un four en quartz chauffé à 1020 °C contenant de l'oxyde de chrome, du cuivre réduit et des granules d'aluminate de cobalt (Silvered cobalt oxide). Les gaz produits, sont alors transportés par la phase mobile (He, 90 mL.min⁻¹) jusqu'à un piège à anhydride (perchlorate de magnésium). Le N₂ et le CO₂ sont ensuite complètement séparés à l'aide d'une colonne de chromatographie gazeuse Porapak Q (3 m x 6,35 mm) chauffée à 45 °C, puis ionisés par impact électronique (120 eV, 10⁻⁶ mbar). Les ions formés (N₂⁺ et CO₂⁺) sont enfin accélérés par un potentiel de 3 kV et projetés dans un champ magnétique uniforme (0,75 T) afin d'être continuellement mesurés pour des m/z de 28, 29, 30 et de 44, 45, 46, respectivement, au sein de cage de Faraday reliées à des amplificateurs. Les compositions isotopiques du carbone et de l'azote sont déterminées dans le même set d'analyse à l'aide du mode "Dual Gas Acquisition".

Le processus de recueil de données est réalisé à l'aide du logiciel d'acquisition Isodat NT 3.0 Software (Thermo Fisher Scientific). Les pourcentages de carbone (% C) et d'azote (% N) sont calculés à partir du rapport d'aire sous la courbe du pic de l'échantillon sur le pic du standard de travail. Le rapport C/N est calculé afin de vérifier la bonne combustion et la bonne qualité de l'échantillon (valeurs comprises entre 2,9 et 3,8).

- **Détermination des rapports isotopiques**

La SMRI permet de déterminer avec précision le teneur relative d'un isotope donné dans une espèce chimique ou dans un échantillon biologique. La composition isotopique est exprimée par l'abondance relative A ou par le rapport isotopique R.

$$A^{15} = \frac{^{15}\text{N}}{(^{15}\text{N} + ^{14}\text{N})} \quad A^{13} = \frac{^{13}\text{C}}{(^{13}\text{C} + ^{12}\text{C})}$$

$$R^{15} = \frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \quad R^{13} = \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}$$

Les mesures sont effectuées par comparaison du N₂ et du CO₂ provenant de la combustion de l'échantillon par rapport à des gaz de référence. Compte tenu des faibles variations de R et A, l'échelle relative (notée δ) est exprimée en ‰.

$$\delta(\text{‰}) = \left[\left(\frac{R_{\text{éch}}}{R_{\text{ref}}} \right) - 1 \right] \times 1000$$

Les valeurs R_{éch} et R_{ref} correspondent respectivement aux rapports isotopiques de l'échantillon et de la référence. L'échelle relative δ également nommée "composition isotopique" traduit l'enrichissement ou l'appauvrissement d'un échantillon en isotopes lourds par rapport à la référence.

- **Références utilisées en SMRI**

Les gaz de références utilisés au laboratoire CEISAM sont calibrés contre les références internationales IAEA-N1 ($\delta^{15}\text{N} = 0,46 \pm 0,17 \text{ ‰}$) et IAEA-N2 ($\delta^{15}\text{N} = 20,31 \pm 0,19 \text{ ‰}$) pour le N_2 et IAEA 305A ($\delta^{13}\text{C} = 39,8 \pm 0,25 \text{ ‰}$) et NBS 22 ($\delta^{13}\text{C} = -30,031 \pm 0,043 \text{ ‰}$) pour le CO_2 (IAEA, Vienne, Autriche). Les ratios isotopiques des standards (R_{std}) $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ et $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ($R_{\text{std}}=0,0112372$ et $R_{\text{std}}=0,0036765$, respectivement) proviennent des références internationales, soit Vienna Pee Dee Belemnite (V-PDB) pour le carbone et le N_2 atmosphérique (AIR) pour l'azote.

L'acide glutamique (AG) dont les $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ sont connus et stables, $-27,48 \pm 0,05 \text{ ‰}$ et $-4,80 \pm 0,08 \text{ ‰}$, respectivement, est utilisé comme standard secondaire dit "de travail". La calibration effectuée avec cet aminoacide de référence est réalisée au début de chaque série (3 capsules), puis toutes les 10 capsules (2 capsules), ainsi qu'en fin de série (2 capsules), afin de contrôler une éventuelle dérive de l'appareil. Des blancs (capsules vides) sont élégamment effectués avant chaque set d'analyses. La linéarité de l'appareil est de $\pm 0,02\text{‰}$; la précision de $\pm 0,3 \text{ ‰}$ pour $\delta^{13}\text{C}$ et $\pm 0,5 \text{ ‰}$ pour $\delta^{15}\text{N}$.

- **Calcul de la quantité de ^{15}N issu du pulse de K^{15}NO_3 (au sein d'un organe)**

Afin de distinguer dans chaque organe le ^{15}N issu du pulse du ^{15}N issu de l'abondance naturelle (fertilisation en KNO_3 post-pulse), le jeu d'équations suivant est utilisé, où n représente la quantité d'azote (exprimée en moles), m représente la masse totale d'azote (exprimée en g), MM représente la masse molaire de l'isotope (en g mol^{-1}), $A_{\text{éch}}$ et A_{nat} correspondent respectivement à l'abondance de l'échantillon et l'abondance naturelle obtenue grâce aux plantes non-amendées en ^{15}N :

$$m_{N_{\text{total éch}}} = \%N_{\text{éch}} \times MS_{\text{éch}}$$

$$n_{N_{\text{total éch}}} = \frac{m_{N_{\text{total éch}}}}{(A_{\text{éch}} \times MM_{^{15}\text{N}}) + ((1 - A_{\text{éch}}) \times MM_{^{14}\text{N}})} = \frac{m_{N_{\text{total éch}}}}{A_{\text{éch}} + 14}$$

$$n_{^{15}\text{N}_{\text{pulse}}} = n_{^{15}\text{N}_{\text{éch}}} - n_{^{15}\text{N}_{\text{nat}}} \quad n_{^{15}\text{N}_{\text{pulse}}} = (A_{\text{éch}} - A_{\text{nat}}) \times n_{N_{\text{total éch}}}$$

$$n_{^{15}\text{N}_{\text{pulse}}} = (A_{\text{éch}} - A_{\text{nat}}) \times \frac{m_{N_{\text{total éch}}}}{A_{\text{éch}} + 14}$$

- **Calcul des flux de ^{15}N issu du pulse de K^{15}NO_3**

Dans nos travaux, la remobilisation du ^{15}N est présentée après 3 jpp, suite à l'absorption par la plante de la quantité maximale de ^{15}N , de façon à ne pas avoir à prendre en compte le ^{15}N nouvellement absorbé puis assimilé par le compartiment foliaire, et ne s'intéresser qu'à la remobilisation de ce dernier (cf. p 215). La méthode expérimentale étant destructive, la quantification du ^{15}N remobilisé a été effectuée par analyse combinatoire, la valeur affichée correspondant à la moyenne de tous les couples "individu t soustrait à individu t + 1". Ainsi les

quantités de ^{15}N remobilisé, exprimées en μg de ^{15}N issu du pulse entre deux dates de récolte (t et t+1), sont calculées de la façon suivante pour chaque organe.

$$n_{^{15}\text{N}_{pulse\ remobilisé}} = n_{^{15}\text{N}_{pulse\ t+1}} - n_{^{15}\text{N}_{pulse\ t}}$$

Nous posons l'hypothèse qu'un organe perdant du ^{15}N issu du pulse entre t et t+1 correspond à un organe source, alors qu'un organe accumulant une plus grande quantité de ^{15}N à t+1 qu'à t est considéré comme un organe puits obtenant le ^{15}N d'une remobilisation.

Les flux de ^{15}N issu du pulse, exprimés en μg de ^{15}N par jour sont issus de l'équation ci-dessous :

$$flux\ n_{^{15}\text{N}_{pulse\ organe}} = \frac{n_{^{15}\text{N}_{pulse\ t+1}} - n_{^{15}\text{N}_{pulse\ t}}}{nombre\ de\ jours}$$

L'expression sous forme de cinétique des flux de ^{15}N issu du pulse (en μg par jour) au sein du compartiment foliaire nécessite la prise en compte de la charge de ^{15}N . Pour cela, nous posons l'hypothèse que le ^{15}N est assimilé par le compartiment foliaire, puis remobilisé vers les autres organes. Ainsi, la quantité de ^{15}N assimilé est calculée de la façon suivante, à partir de la somme de l'ensemble des compartiments.

$$n_{^{15}\text{N}_{pulse\ assimilé\ total\ t/t+1}} = n_{^{15}\text{N}_{pulse\ total\ t+1}} - n_{^{15}\text{N}_{pulse\ total\ t}}$$

Les flux de ^{15}N issu du pulse et remobilisé par le compartiment foliaire, exprimés en μg de ^{15}N par jour, sont alors calculés à partir de l'équation ci-dessous :

$$flux\ n_{^{15}\text{N}_{pulse\ remobilisé\ feuille}} = \frac{n_{^{15}\text{N}_{pulse\ feuille\ t+1}} - n_{^{15}\text{N}_{pulse\ feuille\ t}} - n_{^{15}\text{N}_{pulse\ assimilé\ total\ t/t+1}}}{nombre\ de\ jours}$$

1.3 Analyse complémentaire : mesure de la capacité enzymatique Nitrate Réductase *in vitro*

- **Extraction de la nitrate réductase (NR)**

Les plantes utilisées pour cette expérimentation sont cultivées en système de mini-rhizotron (chapitre 1), avec seulement deux plants de colza (var. Expert) par boîte, de façon à permettre un meilleur développement de la plante hôte. Les échantillons (feuilles adultes du colza et tubercules d'orobanche) sont récoltés entre 3 et 4h après le début de l'héméropériode, afin d'optimiser l'activité NR extraite (Lillo *et al.*, 2001, 2004).

Deux grammes de matériel frais congelé dans l'azote liquide sont broyés au mortier pilon préalablement refroidi à l'azote liquide. Ce broyat est ensuite suspendu à 4 °C dans 5 mL de tampon d'extraction (HEPES-KOH 100 mM, MgCl_2 15 mM, DTT 5 mM, Caséine 0,02 %, BSA 0,05 % et FAD 10 mM ; pH = 7,6) additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases pour extraits végétaux (33 $\mu\text{L g}^{-1}$ MF, Sigma-Aldrich) et de PVPP (50 % g^{-1} MF) nécessaire à la chélation des composés phénoliques. L'homogénéisation de cette pâte est difficile mais nécessaire avant

filtration sur deux épaisseurs de gaze et centrifugation du filtrat (12 000 rpm, 30 min, 4 °C). L'extrait obtenu (2,5 mL) est ensuite dessalé sur colonne PD-10 Sephadex® G25 Supelco, avec 3,5 mL de tampon d'extraction.

- **Dosage de l'activité Nitrate Réductase (NRA) *in vitro***

Le protocole utilisé est basé sur la coloration par le réactif de Griess des ions nitrites (NO_2^-) formés par action de la NR sur les ions nitrates présent dans le milieu réactionnel, et sur la comparaison entre un milieu réactionnel contenant du MgCl_2 avec un autre contenant de l'EDTA. Le MgCl_2 participe au maintien de la liaison entre les protéines 14-3-3 et la NR (processus d'inactivation de la NR ; Lambeck *et al.*, 2011), contrairement à l'EDTA (Leleu, 2004).

Afin de tester la NRA dans des conditions propices à son inactivation, 800 μL de milieu réactionnel (HEPES-KOH 62,5 mM, DTT 5 mM, MgCl_2 15 mM, KNO_3 5 mM, FAD 10 μM , NADH 200 μM ; pH = 7,6) sont additionnés de 200 μL d'extrait dessalé. Un témoin ($t = 0$) est réalisé immédiatement en stoppant toute réaction grâce à 125 μL d'acétate de zinc 500 mM. Trois autres tubes sont placés en incubation à 30 °C durant 5, 10 et 20 min respectivement, avant de stopper la réaction par ajout d'acétate de zinc (125 μL).

Parallèlement, la NRA est dosée dans un tampon propice à son activation (HEPES-KOH 62,5 mM, DTT 5 mM, EDTA 15 mM, KNO_3 5 mM, FAD 12,5 μM , NADH 250 μM ; pH = 7,6). Dans ce cas, les tubes contenant au préalable 200 μL d'extrait dessalé, 10 μL d'EDTA 500 mM, 10 μL d'AMP 120 mM et 10 μL de NaPPi 120 mM sont pré-incubés 15 min à 30 °C avant l'ajout des 800 μL de milieu réactionnel. Le reste du test est identique à celui décrit ci-avant.

Une fois la NRA stoppée et suite à une centrifugation (6000 g, 5 min, température ambiante), 950 μL de surnageant sont transférés dans un tube de 2 mL. L'excès de NADH est alors éliminé par ajout de 50 μL de PMS 1 mM (10 min à température ambiante et à l'obscurité) afin d'éviter toute interférence avec l'analyse des nitrites (Tsikas, 2007).

La quantification des ions nitrites formés est réalisée par ajout de 1 mL d'une solution de sulfanilamide 1 % / NEDCH 0,02 % (v/v). Après une incubation de 20 min à température ambiante et à l'obscurité, une coloration rosée - rouge violacée apparaît en présence d'ions nitrites. La quantification est effectuée par lecture de la densité optique à 540 nm et comparaison avec une gamme étalon de nitrites (1,5 à 30 μM). La NRA est exprimée en $\text{nmol NO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$. Le pourcentage d'inactivation de la NR correspond au ratio entre l'activité NR- MgCl_2 sur l'activité NR-EDTA multiplié par 100.

- **Analyse statistique des données**

Les analyses de variance (ANOVA) sont réalisées en utilisant un modèle linéaire généralisé à l'aide des logiciels SigmaPlot version 10.0 et SigmaStat version 3.5 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA), suivi par une comparaison multiple de moyennes à l'aide du test SNK ou de la méthode Holm-Sidak ($P < 0,05$).

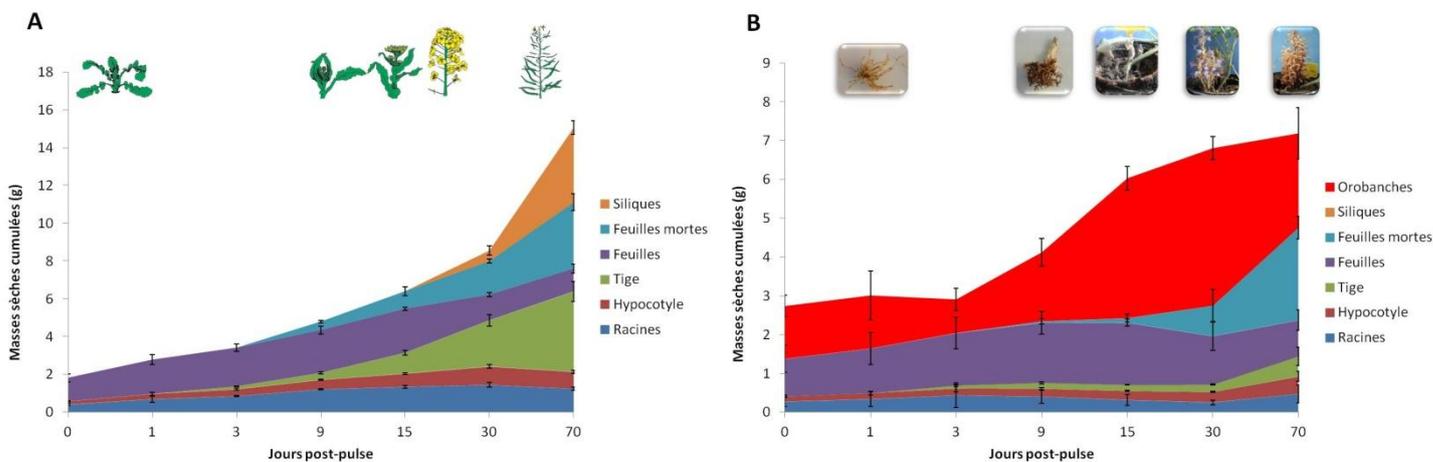


Figure 2.2 : Cinétiques d'accumulation de biomasse en conditions de non-infestation (A) et d'infestation par l'orobanche rameuse (B), chez le génotype de colza sensible ES Alienor. Cultures en serre alimentées en $K^{15}NO_3$ (250 μM , enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de Liquoplant™ FD 134 Hiver 3 %. Les données expriment les biomasses cumulées (n = 6, moyennes \pm ET).

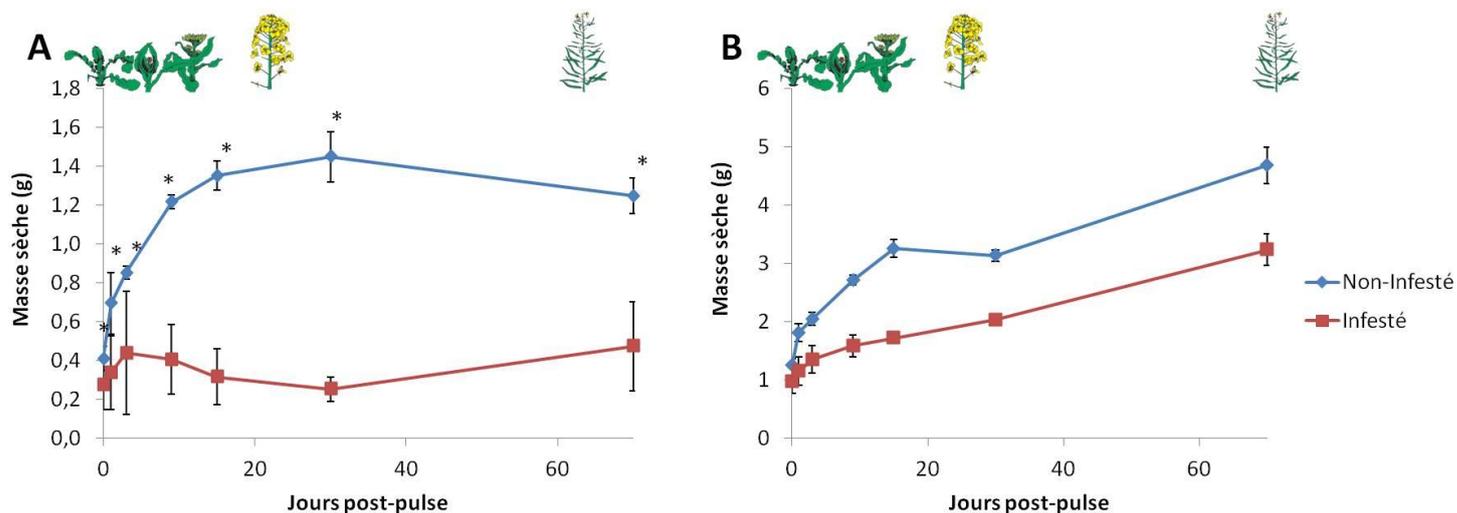


Figure 2.3 : Cinétiques d'accumulation de biomasse racinaire (A) et foliaire (feuilles + feuilles mortes ; B), chez le génotype de colza sensible ES Alienor en conditions de non-infestation (bleu) et d'infestation par l'orobanche rameuse (rouge). Cultures en serre alimentées en $K^{15}NO_3$ (250 μM , enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de Liquoplant™ FD 134 Hiver 3 % (n = 6, moyennes \pm ET, ANOVA, * $P < 0,05$ non-infesté *versus* infesté, *t*-test).

2 Résultats

2.1 Absorption, translocation et flux d'azote dans l'interaction entre un génotype de colza très sensible (var. ES Alienor) et l'orobanche rameuse

- **Évolution de la biomasse des différents compartiments du colza non-infesté et de l'interaction**

L'analyse de l'évolution des biomasses sèches donne un premier aperçu des modifications des relations sources-puits engendrées chez le colza par l'infestation (**Fig. 2.2**). En conditions de non-infestation, le colza gagne de la biomasse tout au long de son cycle de développement (**Fig. 2.2A et 2.5A**), avec une part importante accumulée en premier lieu par le compartiment foliaire, de la sortie de vernalisation ($68,6 \pm 11,7$ %) jusqu'à 15 jpp ($36,5 \pm 1,4$ %), puis par la tige de la montaison à la floraison entre 15 et 30 jpp (stades ontogénétique du colza D, E et F ; développement de la tige principale puis des axes secondaires), et par les siliques durant la phase de fructification (stades G2 - G5, entre 30 et 70 jpp). Les biomasses du système racinaire et de l'hypocotyle sont maximales à 30 jpp et diminuent parallèlement à la prise de biomasse des siliques. À 70 jpp, la tige (axes principal et secondaires) représente ainsi $28,3 \pm 3,6$ % de la biomasse sèche totale contre $26,4 \pm 2,5$ % pour les siliques et $23,3 \pm 3,0$ % pour les feuilles tombées au sol.

En conditions d'infestation, les orobanches fixées limitent considérablement le développement du colza hôte (var. très sensible ES Alienor) en post-vernalisation, leur biomasse globale à 0 jpp étant semblable à celle du compartiment foliaire du colza ($1,4 \pm 0,3$ g contre $1,0 \pm 0,3$ g respectivement ; $n = 6$, t -test non-significatif). La biomasse allouée à chaque compartiment du colza est sensiblement impactée par l'infestation, avec notamment une prise de biomasse très faible de la tige, et nulle des siliques qui ne se développent pas (**Fig. 2.2B**). La biomasse allouée au système racinaire et au compartiment foliaire (feuilles + feuilles mortes) du colza est significativement inférieure en conditions d'infestation, tout au long du cycle de développement (**Fig. 2.3A et 2.3B**). La biomasse allouée aux feuilles mortes est également significativement inférieure en conditions d'infestation (**Fig. 2.4A**), le processus de sénescence foliaire présentant de plus un retard entre 3 et 15 jpp en réponse à l'infestation (**Fig. 2.4B**). Sachant que la biomasse totale du colza infesté est significativement inférieure à celle du colza non-infesté (**Fig. 2.5A**), il est intéressant de noter que la biomasse totale de l'interaction (colza + orobanches) est significativement plus importante que celle du colza non-infesté à 0 jpp ($n = 6$, t -test significatif), mais que son évolution est par la suite nettement ralentie en post-vernalisation pour ne représenter à 70 jpp que la moitié de la biomasse du colza non-infesté ($15 \pm 0,7$ g contre $7,1 \pm 1,1$ g ; $n = 6$, t -test significatif ; **Fig. 2.5B**).

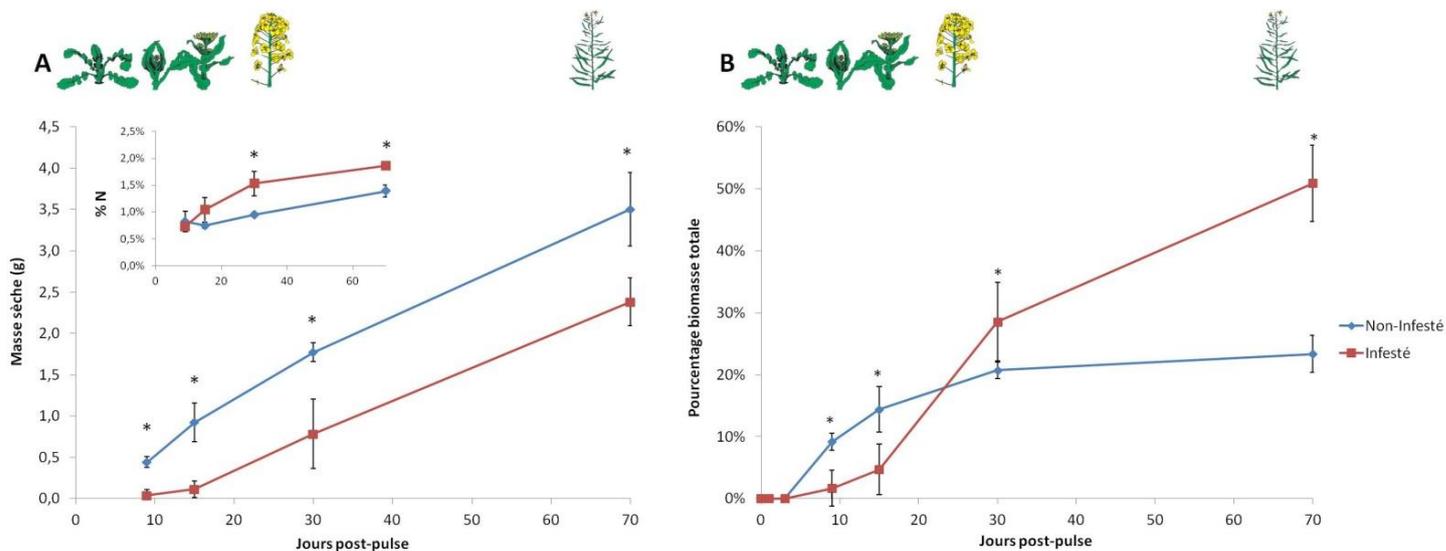


Figure 2.4 : Impact du parasitisme sur l'accumulation de biomasse dans les feuilles mortes (A, graphique principal), sur leur teneur en azote (A, graphique intérieur), et sur le pourcentage de la biomasse totale de colza alloué aux feuilles mortes (B), chez le génotype de colza sensible ES Alienor. Cultures en serre alimentées en $K^{15}NO_3$ (250 μM , enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de Liquoplant™ FD 134 Hiver 3 ‰ (n = 6, moyennes \pm ET, * $P < 0,05$ non-infesté versus infestés, t-test).

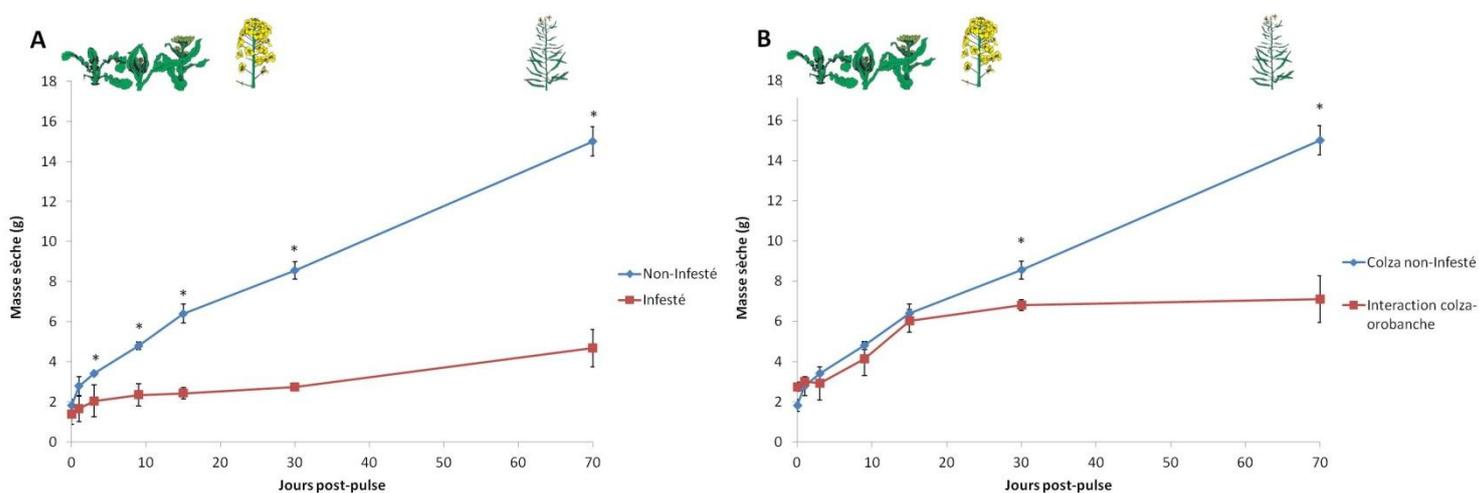


Figure 2.5 : Cinétiques d'accumulation de biomasse au sein du colza seul (A) et de l'interaction colza - orobanche (B), génotype ES Alienor. Cultures en serre alimentées en $K^{15}NO_3$ (250 μM , enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de Liquoplant™ FD 134 Hiver 3 ‰ (n = 6, moyennes \pm ET, ANOVA, * $P < 0,05$ non-infesté versus infesté, t-test).

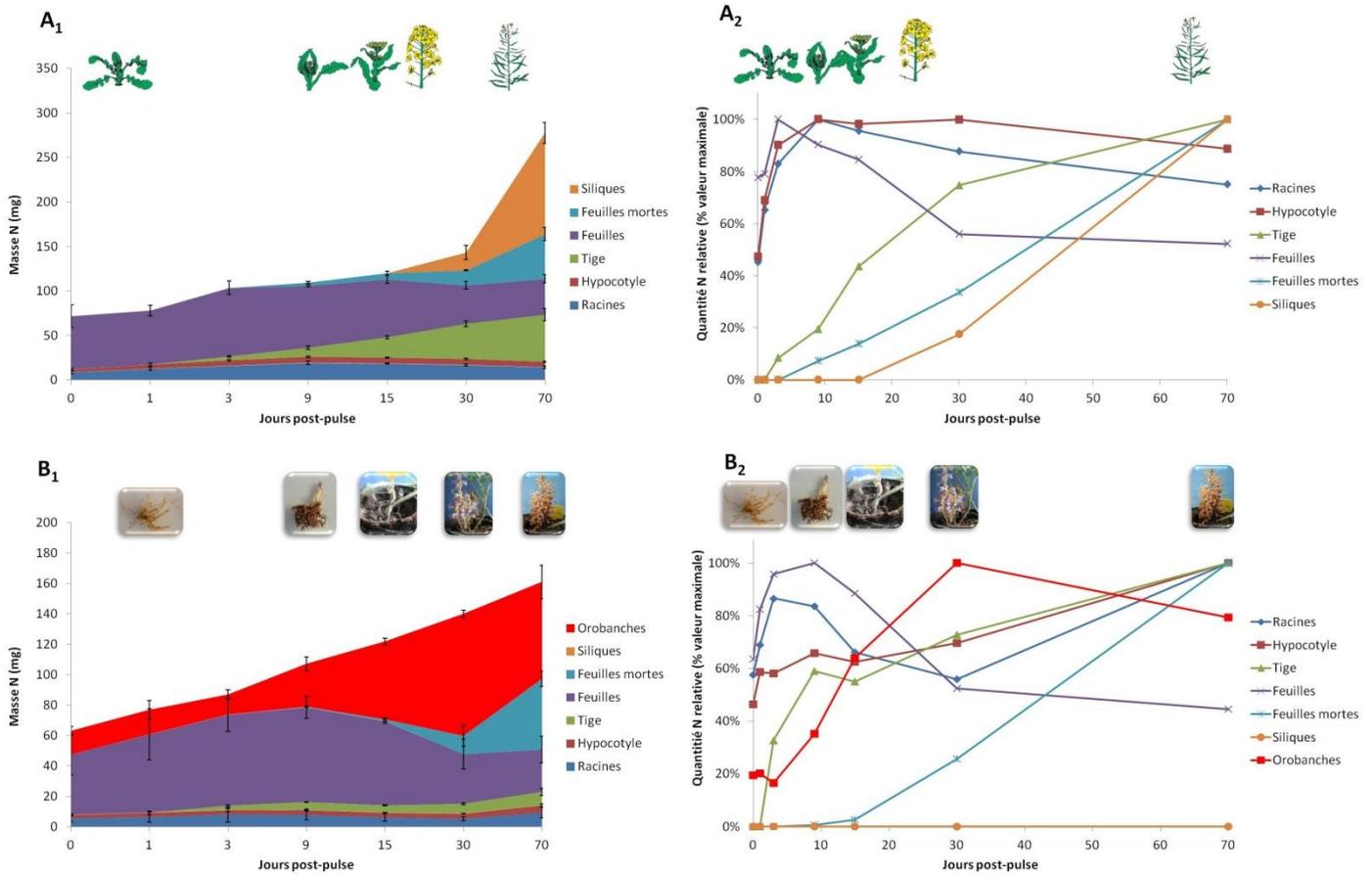


Figure 2.6 : Cinétiques d'accumulation d'azote total en conditions de non-infestation (A) et d'infestation par l'orobanche rameuse (B), chez le génotype de colza sensible ES Alienor. Cultures en serre alimentées en $K^{15}NO_3$ (250 μM , enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de LiquoplantTM FD 134 Hiver 3 %. Les données expriment les quantités d'azote total cumulées (n = 6, moyennes \pm ET ; A₁ et B₁) et les quantités d'azote relatives (% de la valeur totale maximale du compartiment, n = 6, moyennes \pm ET ; A₂ et B₂).

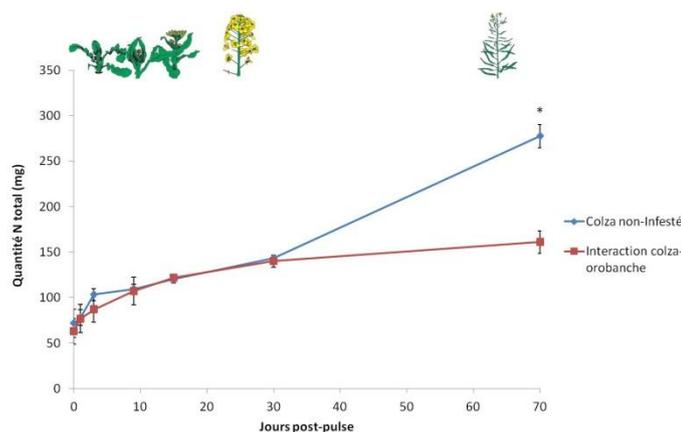


Figure 2.7 : Cinétiques d'accumulation de l'azote chez le génotype de colza sensible ES Alienor en conditions de non-infestation et dans l'interaction colza - orobanche rameuse. Cultures en serre alimentées en $K^{15}NO_3$ (250 μM , enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de LiquoplantTM FD 134 Hiver 3 % (n = 6, moyennes \pm ET, $P < 0,05$ non-infesté versus infestés statistiquement non différents, t -test).

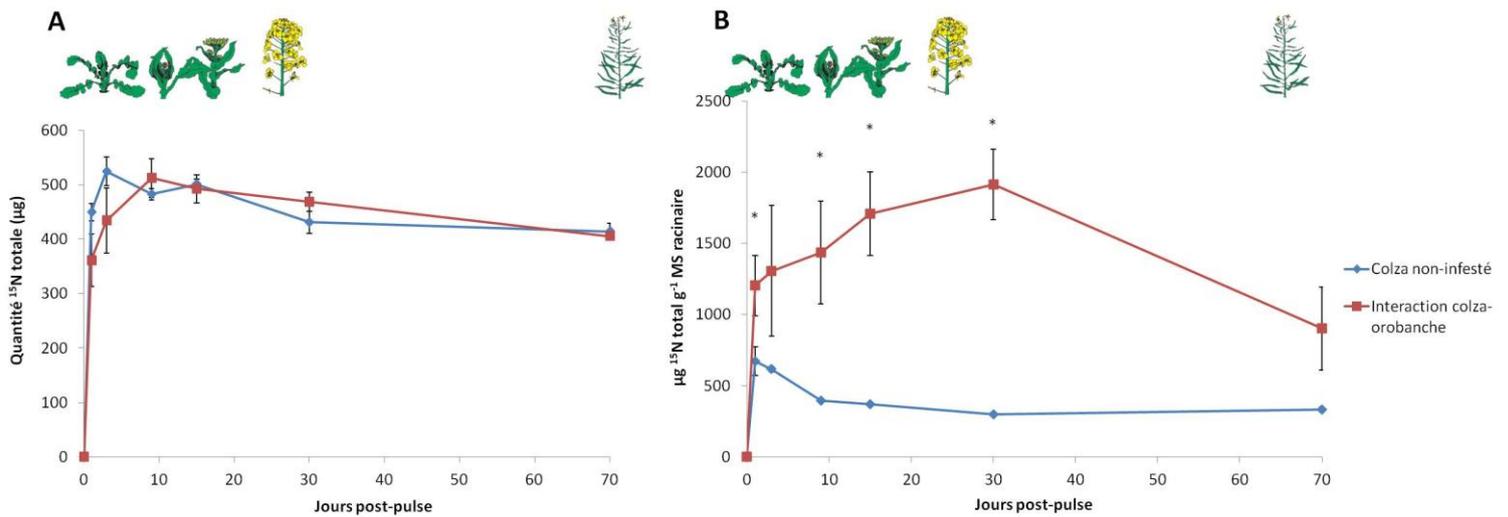


Figure 2.8 : Cinétiques d'accumulation du ^{15}N absorbé total (A) et du ^{15}N absorbé total par g de matière sèche racinaire (B), chez le colza non-infesté (var. sensible ES Alienor) et dans l'interaction colza - orobanche rameuse. Cultures en serre alimentées en K^{15}NO_3 (250 μM , enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de LiquoplantTM FD 134 Hiver 3 ‰ (n = 6, moyennes \pm SE, * $P < 0,05$ non-infesté versus infestés, *t*-test).

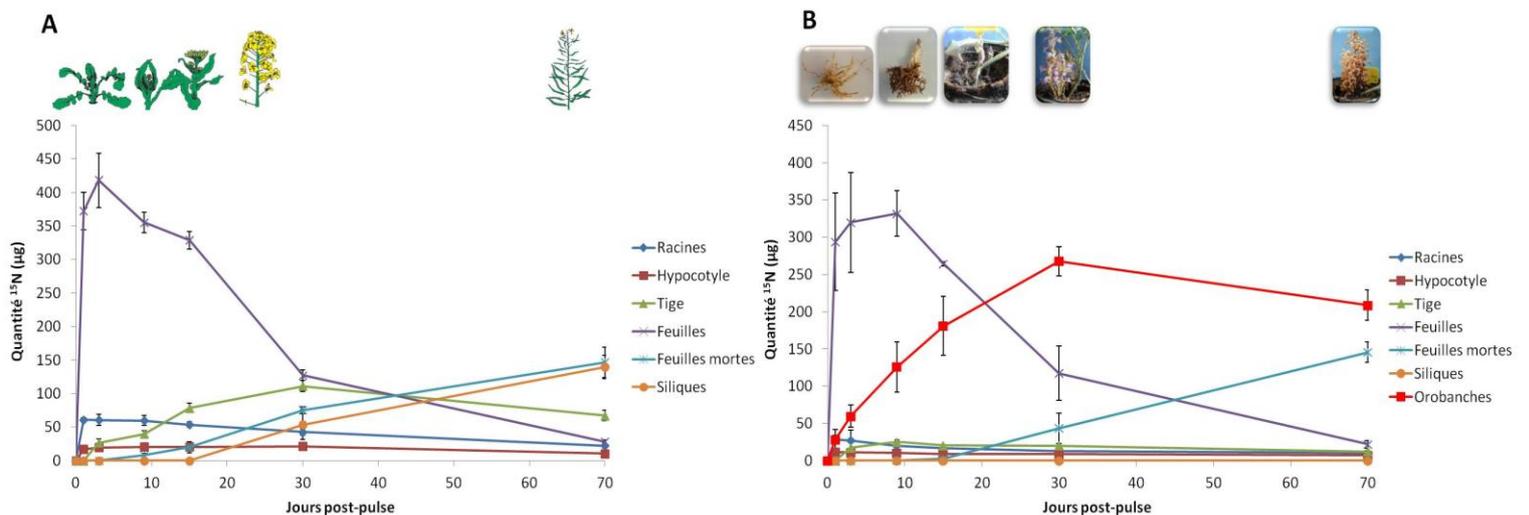


Figure 2.9 : Cinétiques d'accumulation du ^{15}N en conditions de non-infestation (A) et d'infestation par l'orobanche rameuse (B), chez le génotype de colza sensible ES Alienor. Cultures en serre alimentées en K^{15}NO_3 (250 μM , enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de LiquoplantTM FD 134 Hiver 3 ‰ (n = 6, moyennes \pm ET).

- **Évolution de l'accumulation d'azote total dans les différents compartiments du colza non-infesté et de l'interaction**

Bien que liée à l'évolution des biomasses, l'évolution de la quantité d'azote total caractérise plus précisément l'importance des différents compartiments du point de vue des relations sources/puits vis-à-vis de l'azote (**Fig. 2.6A₁ et B₁**). Ainsi, cette étude conduit à une meilleure caractérisation des flux d'azote, exprimée en pourcentage de la teneur maximale en azote de chaque compartiment, en conditions de fertilisation optimale (**Fig. 2.6A₂ et B₂**). En conditions de non-infestation, les feuilles représentent le principal puits d'azote en sortie de vernalisation ($83,4 \pm 18,1$ % de l'azote total). À partir de 9 jpp (développement du bouton floral, stades D et E), le taux d'azote foliaire diminue de façon concomitante à une augmentation importante du contenu en azote de la tige (axes primaires et secondaires ; **Fig. 2.6A₂**). Aux alentours de 30 jpp (période de transition entre la floraison et le début du remplissage des graines), l'azote est principalement partagé entre les feuilles ($30,1 \pm 3,0$ %), la tige ($27,7 \pm 2,3$ %) et le système racinaire ($11,8 \pm 0,6$ %), bien qu'une partie soit déjà allouée aux siliques ($14,0 \pm 5,4$ % ; **Fig. 2.6A₁**). Les relations sources/puits sont par la suite orientées vers l'enrichissement en azote de la tige et surtout des siliques, ces compartiments devenant les seuls compartiments puits (**Fig. 2.6A₂**). Notons qu'une déperdition d'azote constante est observée à partir de 9 jpp (stades C et D) par le biais des feuilles mortes tombées au sol, allant jusqu'à 18 % ($50,1 \pm 7,5$ mg) de l'azote totale à 70 jpp.

Lors de l'infestation, les orobanches fixées représentent un puits d'azote non-négligeable pour le colza puisqu'elles accumulent $24,8 \pm 4,5$ % de l'azote total de l'interaction dès la sortie de vernalisation (0 jpp ; **Fig. 2.6B₁**). Le compartiment foliaire du colza hôte reste toutefois le compartiment d'accumulation majoritaire de l'interaction avec $63,3 \pm 21,7$ % de l'azote (0 jpp ; **Fig. 2.6B₁**). Le profil d'accumulation de l'azote ne reflète donc pas, dans ce cas, celui de la biomasse (**Fig. 2.2B**). En effet, l'azote est plus faiblement mobilisé que le carbone avant la croissance printanière, comme le montre l'évolution du rapport N/C entre 0 et 30 jpp ($3,9 \pm 0,2$ % et $5,4 \pm 0,4$ %, respectivement, *t*-test significatif). La quantité d'azote allouée aux feuilles du colza hôte diminue à partir de 9 jpp (**Fig. 2.6B₁**). Cette diminution ne s'accompagne pas d'une forte accumulation dans les tiges puis dans les siliques, comme observée en conditions de non-infestation (**Fig. 2.6A₂**), mais dans le compartiment parasitaire (**Fig. 2.6B₂**). En effet, les orobanches fixées deviennent le compartiment puits majoritaire accumulant dès 30 jpp une plus grande quantité d'azote que l'intégralité du colza hôte ($80,3 \pm 2,4$ mg et $59,7 \pm 5,9$ mg, respectivement ; *n* = 6, *t*-test significatif ; **Fig. 2.6B₁**). Bien que la biomasse des feuilles mortes soit significativement réduite lors de l'infestation, le pourcentage d'azote des feuilles tombées est supérieur chez le colza infesté à partir de 30 jpp (**Fig. 2.4A**), même si la quantité d'azote reste au final équivalente ($50,1 \pm 7,4$ mg et $46,6 \pm 5,0$ mg, en conditions de non-infestation et d'infestation respectivement). Il est intéressant de noter que la quantité d'azote total de l'interaction colza - orobanche est identique à celle du colza non-infesté jusqu'à 30 jpp, puis significativement inférieure 70 jpp (**Fig. 2.7**).

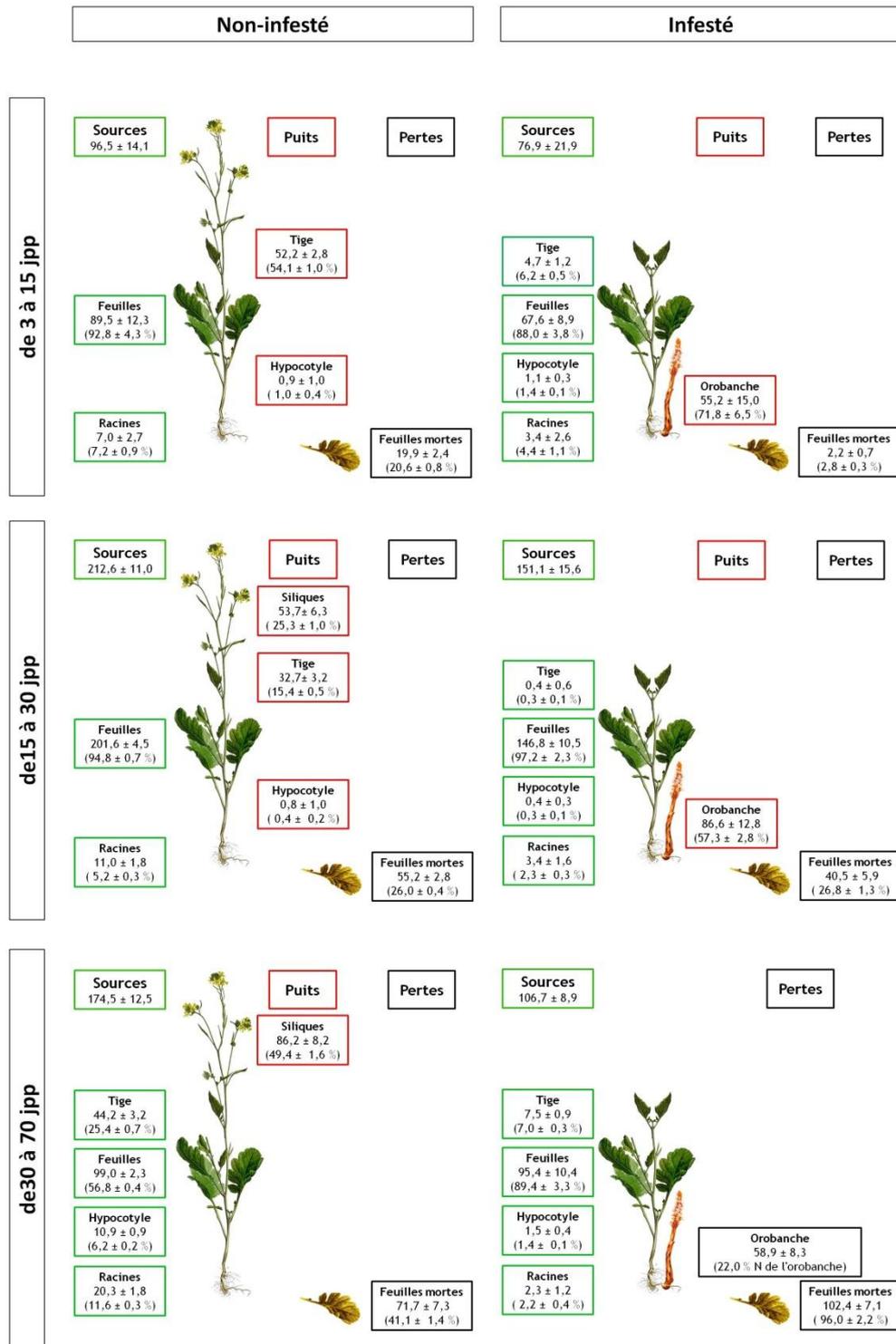


Figure 2.10 : Remobilisation du ^{15}N en conditions de non-infestation (gauche) et d'infestation par l'orobanche rameuse (droite), durant les périodes clefs du développement du génotype sensible de colza ES Alienor. Cultures en serre alimentées en K^{15}NO_3 (250 μM , enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de LiquoplantTM FD 134 Hiver 3 ‰. Montaison de 3 à 15 jpp; floraison et début de fructification de 15 à 30 jpp; remplissage des graines de 30 à 70 jpp. Les quantités de ^{15}N sont exprimées en μg par plante, et en pourcentage du ^{15}N remobilisé total (n = 6, moyennes des analyses combinatoires \pm SE). Les organes sources sont représentés en vert, les organes puits en rouge et les pertes d'azote en noir. jpp : jours post-pulse.

2.2 Dynamique de l'azote dans l'interaction suivie par traçage isotopique ($^{15}\text{NO}_3^-$)

- **Absorption et translocation des nitrates marqués**

La quantité de ^{15}N apporté au colza ou à l'interaction durant le pulse est de 750 μg ($t = 0, 0$ jpp). La majeure partie du ^{15}N fourni est absorbée durant le pulse et la quantité maximale absorbée est atteinte à 3^{ème} jpp (**Fig. 2.8**). L'infestation n'impacte pas la quantité de ^{15}N absorbée par les racines du colza. En effet, environ 70 % du $^{15}\text{NO}_3^-$ fourni est accumulé aussi bien dans le colza non-infesté que dans l'interaction colza - orobanche rameuse. Toutefois, il est intéressant de noter que, du fait de l'impact négatif de l'infestation sur la biomasse racinaire du colza hôte (**Fig. 2.3A**), la quantité totale de ^{15}N absorbé par g de matière sèche racinaire est significativement supérieure en conditions d'infestation dès 1 jpp (**Fig. 2.8B**).

La translocation initiale du ^{15}N absorbé s'effectue de façon identique chez les colzas non-infestés et infestés. En effet, la majeure partie du ^{15}N absorbé (plus de 80 %) est directement allouée aux feuilles après absorption (**Fig. 2.9**), ce compartiment correspondant donc au site principal d'assimilation des nitrates chez le colza infesté ou non. Ces résultats suggèrent que l'orobanche ne prélève pas d'azote directement sous forme de nitrates, mais capte uniquement le ^{15}N ayant déjà transité par le compartiment foliaire de la plante hôte. Ainsi, les orobanches fixées n'interceptent que $28,2 \pm 5,9 \mu\text{g}$ de ^{15}N , soit $7,8 \pm 1,6 \%$ du ^{15}N total de l'interaction à 1 jpp, qui reflète potentiellement une translocation rapide d'azote réduit issu de l'assimilation par le colza du ^{15}N fourni la veille.

Cela corrobore avec le fait qu'une activité Nitrate Réductase totale (*in vitro*) de $51,12 \pm 3,63 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$, 275 fois supérieure à la limite de détection de la méthode, est mesurable dans les feuilles de colza, alors qu'aucune activité (ni aucune inhibition de cette activité) n'est détectable dans les jeunes tubercules d'orobanche.

- **Dynamique de remobilisation du ^{15}N**

Dans nos expérimentations, la quantité de ^{15}N absorbée est maximale à 3 jpp. Au-delà, nos résultats montrent qu'en conditions de non-infestation, la remobilisation de ce ^{15}N est maximale au stade floraison (**Fig. 2.10**). En effet, de 3 à 15 jpp, $96,5 \pm 14,1 \mu\text{g}$ de ^{15}N ($18,4 \pm 2,7 \%$ du ^{15}N total de la plante) est remobilisé des feuilles ($89,5 \pm 12,3 \mu\text{g}$ soit $92,8 \pm 4,3 \%$ du ^{15}N remobilisé) et des racines ($7,0 \pm 2,7 \%$) vers la tige ($52,2 \pm 2,8 \%$), principal organe puits du colza lors de la montaison. Durant cette période de développement, $19,9 \pm 2,4 \mu\text{g}$ de ^{15}N ($3,8 \pm 0,5 \%$ du ^{15}N total) sont perdus par le biais des feuilles mortes tombées au sol. La période de floraison et de début de fructification (15-30 jpp) est caractérisée par une remobilisation accrue, puisque $212,6 \pm 11,0 \mu\text{g}$ de ^{15}N , soit $40,5 \pm 2,1 \%$ du ^{15}N total de la plante, sont remobilisés sur cette période. Le compartiment foliaire est la source majoritaire d'azote avec $94,8 \pm 4,5 \%$ du ^{15}N remobilisé, accompagné à un moindre degré des racines ($5,2 \pm 0,3 \%$), pour la croissance et la ramification de la tige ($15,4 \pm 0,5 \%$) et le développement des siliques ($25,3 \pm 1,0 \%$). Toutefois, $55,2 \pm 8,4 \mu\text{g}$ de ^{15}N ($10,5 \pm 0,5 \%$ du ^{15}N total) sont perdus par le biais des feuilles mortes sur

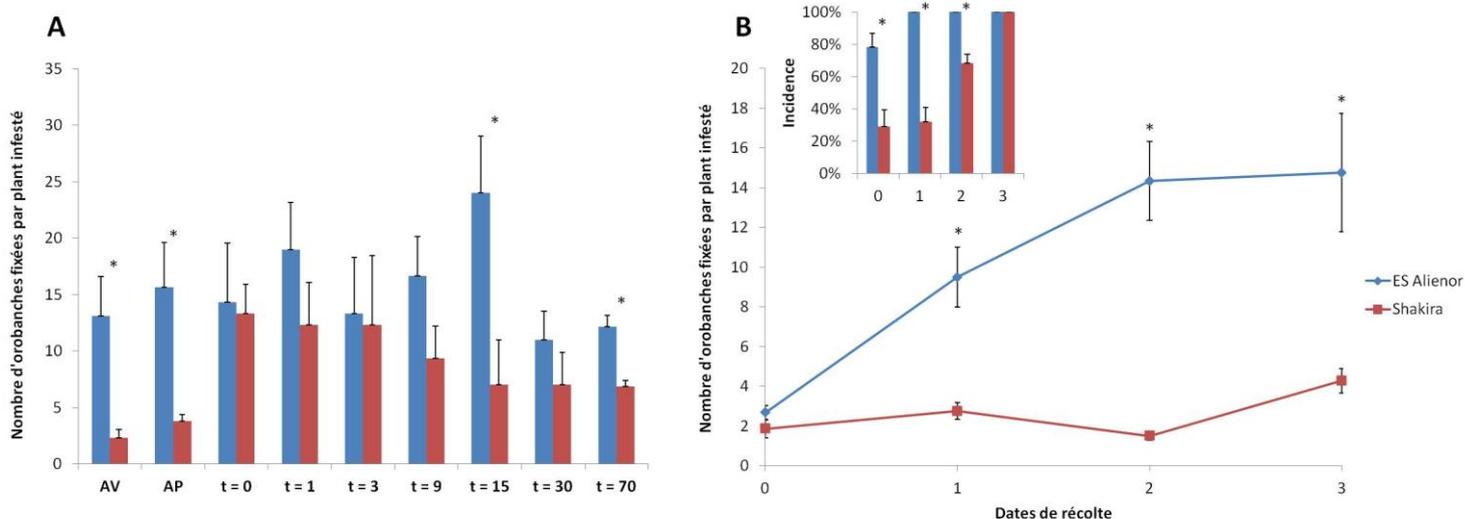


Figure 2.11 : Cinétiques d'infestation par l'orobanche rameuse des génotypes de colza sensible ES Alienor et partiellement résistant Shakira cultivés en serre (A) et au champ (B). Cultures en serre alimentées en $K^{15}NO_3$ (250 μM , enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de LiquoplantTM FD 134 Hiver 3 ‰. Le nombre d'orobanches fixées est évalué par pied infesté, l'incidence parasitaire est déterminée sur l'ensemble des plants récoltés au champ. Dates de récolte en serre : AV, avant vernalisation ; AP, après vernalisation, les différents t correspondent aux jpp (n = 6, moyennes \pm SE, * $P < 0,05$ ES Alienor versus Shakira, t-test). Dates de récolte en champ : 0, décembre ; 1, mars ; 2, avril ; 3, mai (n = 20, moyennes \pm SE, * $P < 0,05$ ES Alienor versus Shakira, t-test).

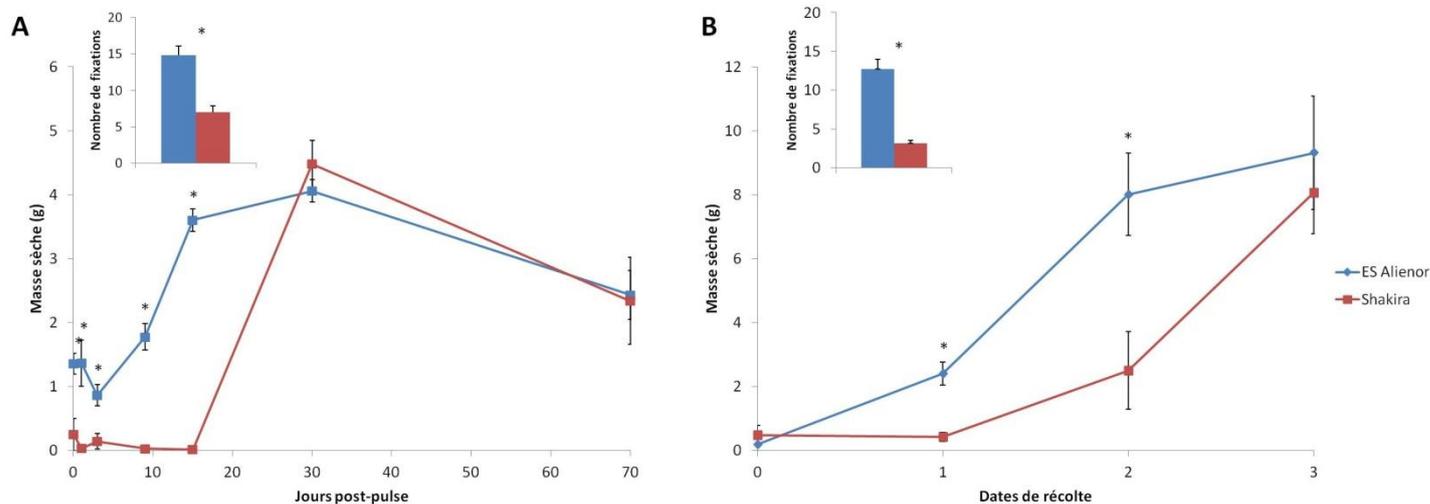


Figure 2.12 : Evolution du puits parasitaire (orobanche rameuse, biomasse et nombre total d'orobanches fixées) en post-vernification sur les variétés sensible ES Alienor et partiellement résistante Shakira. A, Culture en serre ; B, culture au champ. Cultures en serre alimentées en $K^{15}NO_3$ (250 μM , enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de LiquoplantTM FD 134 Hiver 3 ‰. Dates de récolte en champ : 0, décembre ; 1, mars ; 2, avril ; 3, mai (n = 20 pour les courbes et n = 45 pour les histogrammes, moyennes \pm SE, * $P < 0,05$ ES Alienor versus Shakira, t-test).

cette période. Les relations sources/puits sont par la suite exclusivement orientées vers le remplissage des graines (de 30 à 70 jpp), les feuilles, la tige, les racines et l'hypocotyle participent à la remobilisation d'azote ($56,8 \pm 0,4$ %, $25,4 \pm 0,7$ %, $11,6 \pm 0,3$ % et $6,2 \pm 0,2$ %, respectivement) vers les siliques, qui accumulent $49,4 \pm 1,6$ % de ce pool d'azote. Une forte quantité de ^{15}N ($71,7 \pm 21,9$ μg) est effectivement perdue par le biais des feuilles mortes sur cette période ($13,7 \pm 1,4$ % du ^{15}N total).

En conditions d'infestation, l'évolution des relations sources/puits est fortement simplifiée puisque l'orobanche représente un compartiment puits d'azote exclusif tout au long de son cycle de développement (**Fig. 2.10**). Cette affirmation doit toutefois être nuancée par le fait qu'il n'est pas possible dans notre étude de visualiser le puits foliaire que pourraient constituer les jeunes feuilles. Néanmoins, suite à l'assimilation foliaire rapide du ^{15}N chez le colza hôte, tous les compartiments d'accumulation de ^{15}N deviennent des organes sources pour les orobanches fixées, qui en seulement 30 jpp accumule la majeure partie ($57 \pm 4,2$ % du ^{15}N de l'interaction). Le développement du colza (var. très sensible ES Alienor) étant extrêmement limité sous infestation, le compartiment foliaire, premier accumulateur de biomasse (**Fig. 2.2**), est l'organe source principal vis-à-vis du ^{15}N et fourni environ 90 % du ^{15}N remobilisé tout au long du cycle de l'interaction. Comme observé en conditions de non-infestation, la remobilisation du ^{15}N est accentuée entre 15 et 30 jpp (de $76,9 \pm 21,9$ μg à $151,1 \pm 15,6$ μg). Elle est maintenue élevée de 30 à 70 jpp, quasi-totalement en raison de la perte de ^{15}N par les feuilles mortes ($102,4 \pm 7,1$ μg de ^{15}N). Les orobanches ont achevé leur cycle de développement avant 70 jpp. Une perte d'azote des orobanches est observée en fin de cycle de l'interaction. Cette perte est probablement majoritairement artefactuelle, en raison d'une perte inévitable de graines lors de l'échantillonnage (graines minuscules) et du dessèchement et de la déstructuration des tubercules dans le sol à ce stade de développement avancé (biomasse des tubercules récoltés très certainement sous-estimée à 70 jpp).

2.3 Impact du génotype de colza sur l'interaction

Suite à cette description de l'impact de l'infestation sur un génotype très sensible de colza, nous souhaitons maintenant mettre en lumière les caractéristiques génotypiques de la réponse du colza à l'infestation. Pour cela, nous allons comparer les différences majeures que présente le génotype partiellement résistant Shakira vis-à-vis d'ES Alienor.

- **Cinétique de développement du parasite**

Les cinétiques d'infestation sont définies par l'évolution du nombre et de la biomasse totale d'orobanches fixées par pied de colza. En conditions de culture en serre, le scénario d'infestation est tel que le nombre d'orobanches fixées sur chaque génotype de colza est optimal en sortie de vernalisation (dès 0 jpp ; **Fig. 2.11A**). Bien que l'infestation soit précoce pour les deux variétés de colza, la variété ES Alienor présente une sensibilité à l'orobanche significativement plus importante que la variété Shakira avant et pendant vernalisation ($14,3 \pm$

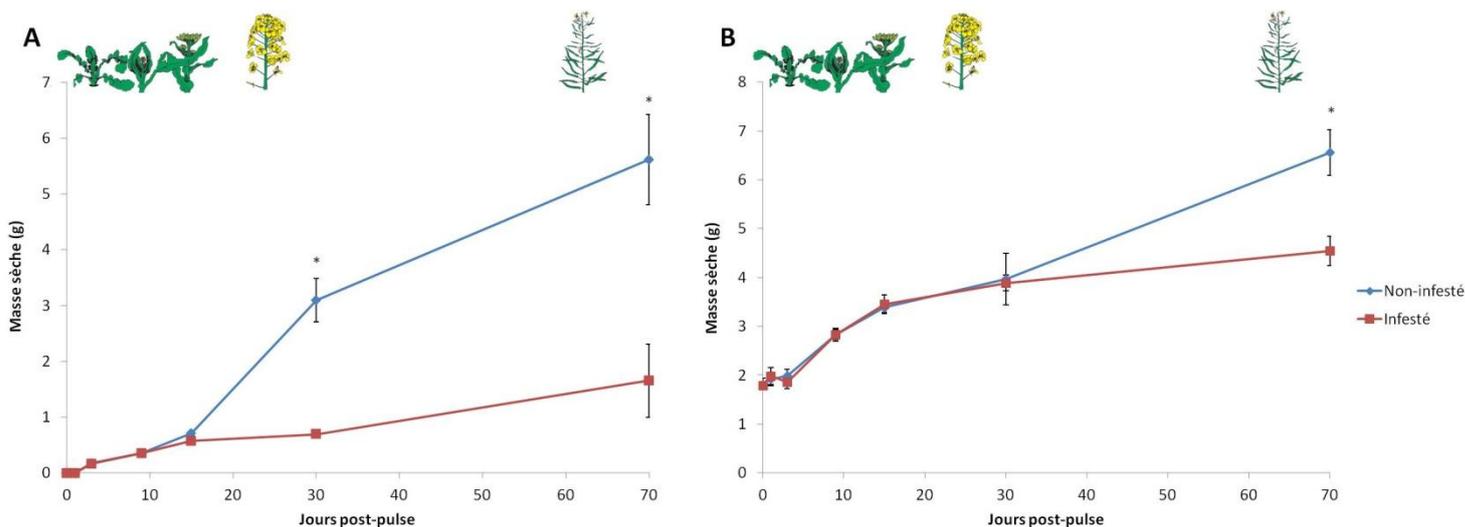


Figure 2.13 : Cinétiques d'accumulation de biomasse de tige (A) et foliaire (feuilles + feuilles mortes ; B), chez le génotype de colza partiellement résistant Shakira, en conditions de non-infestation et d'infestation par l'orobanche rameuse. Cultures en serre alimentées en $K^{15}NO_3$ (250 μM , enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de LiquoplantTM FD 134 Hiver 3 ‰ (n = 6, moyennes \pm SE, ANOVA, * $P < 0,05$ non-infesté versus infesté, t-test).

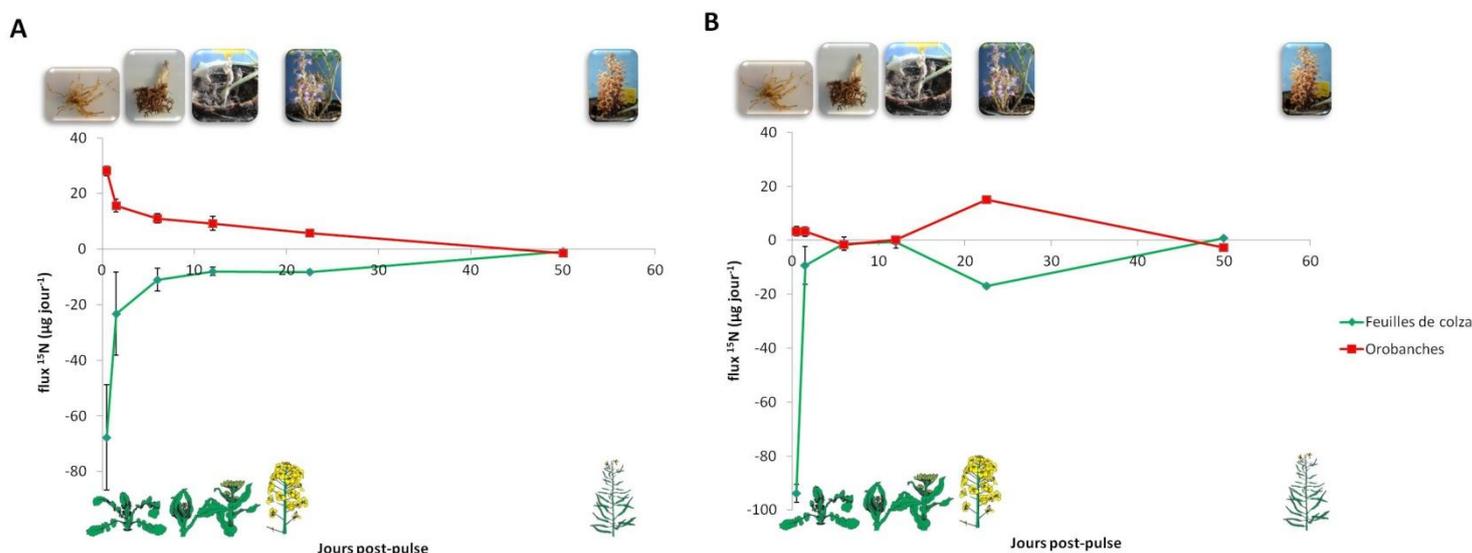


Figure 2.14 : Flux de ^{15}N ($\mu g \text{ jour}^{-1}$) à partir du compartiment foliaire de colza et vers l'orobanche rameuse chez les génotypes sensible ES Alienor (A) et partiellement résistant Shakira (B). Cultures en serre alimentées en $K^{15}NO_3$ (250 μM , enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de LiquoplantTM FD 134 Hiver 3 ‰. Les valeurs négatives traduisent un flux sortant de ^{15}N (organes sources) et les valeurs positives correspondent à un flux entrant (organes puits). Chaque point correspond à la date moyenne séparant deux récoltes (n = 6, moyennes des analyses combinatoires \pm ET).

2,5 et $3,2 \pm 0,5$, respectivement, *t*-test). Le degré d'infestation moyen couvrant l'ensemble de l'expérimentation, exprimé en nombre d'orobanches fixées par plante, est deux fois supérieur pour ES Alienor (**Fig. 2.12A**). En dépit de ce net différentiel, la biomasse totale des orobanches est semblable en fin d'interaction pour les variétés ES Alienor et Shakira. La perte de biomasse observée entre 30 et 70 jpp s'explique principalement par la perte de graines, le dessèchement et la déstructuration des tubercules qui ne facilitent pas l'échantillonnage (artefact). Néanmoins, ces résultats soulignent un effet significatif du génotype sur la cinétique de prise de biomasse des orobanches, avec un retard d'une douzaine de jours en début de post-vernalisation sur Shakira. En effet, le développement des orobanches fixées sur cette variété est quasi-nul de la sortie de vernalisation jusqu'au début de la floraison du colza. Ce retard est ensuite rapidement comblé en 15 jours pour atteindre une biomasse totale équivalente à celle mesurée sur ES Alienor en fin de floraison. Les cinétiques de prise de biomasse du puits parasite sont semblables au champ (**Fig. 2.12B**). Cette constatation valide le dispositif expérimental mis en place au laboratoire.

Toutefois, il existe quelques spécificités de réponse au champ du colza vis-à-vis de l'orobanche. En effet, bien que le nombre d'orobanches fixées par pied de colza parasite n'évolue pas chez le génotype Shakira après la saison hivernale, ES Alienor présente une augmentation graduelle du nombre d'orobanches fixées par pied jusqu'au mois d'avril, ce qui démontre l'existence au champ d'une seconde vague d'infestations (**Fig. 2.11B**). Celle-ci est confirmée par l'évolution de l'incidence parasitaire au cours de la culture (**Fig. 2.11B**). Ainsi, bien qu'un taux très important de pieds infestés de colza (environ 80 %) soit observé dès le mois de décembre pour la variété ES Alienor, l'incidence n'est maximale qu'à partir du mois de mars. Concernant la variété Shakira, l'incidence parasitaire demeure faible (30 %) jusqu'au mois de mars, mais augmente ensuite graduellement jusqu'à atteindre les 100 % au mois de mai. Cette évolution concorde avec l'observation, sous infestation artificielle en pot (**Fig. 2.11A**), d'une augmentation du nombre d'orobanches fixées par plant de colza en sortie de vernalisation. La variété Shakira se distingue donc de la variété ES Alienor au champ par une moindre sensibilité (même caractéristique en pots) et une période de sensibilité printanière plus tardive.

- **Impact de l'infestation sur la biomasse des différents compartiments**

Contrairement à ce qui a été observé chez la variété ES Alienor, l'infestation par l'orobanche n'impacte pas, chez la variété Shakira, la biomasse allouée aux tiges (**Fig. 2.13A**) et au compartiment foliaire (feuilles + feuilles mortes ; **Fig. 2.13B**) jusqu'à 15 et 30 jpp, respectivement. Du fait du faible développement des orobanches fixées (**Fig. 2.12A**), le colza var. Shakira parvient donc à maintenir sous infestation une croissance comparable à celle du colza non-infesté jusqu'à 15 jpp.



Figure 2.15 : Impact de l'infestation par l'orobanche rameuse sur le développement du colza à 70 jpp. Var. très sensible ES Alienor (A) et var. partiellement résistante Shakira (B) en conditions d'infestation (1) et de non-infestation (2). Cultures en serre alimentées en $K^{15}NO_3$ (250 μM , enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de LiquoplantTM FD 134 Hiver 3 ‰. jpp, jours post-pulse.

- **Remobilisation de l'azote**

Les flux de ^{15}N ont été également analysés dans l'interaction Shakira - *P. ramosa* en conditions de culture en serre, et peuvent donc être comparés à ceux de l'interaction ES Alienor - *P. ramosa*. Pour cela, la dynamique de remobilisation du ^{15}N est complétée par une représentation des flux de ^{15}N proprement dit, exprimés en μg de ^{15}N par jour. Cette représentation permet de différencier directement les pertes de ^{15}N (valeurs négatives), des gains de ^{15}N (valeurs positives) au sein des différents compartiments. Ainsi, on s'aperçoit que chez ES Alienor, le ^{15}N foliaire est disponible et remobilisé vers les organes puits (orobanches essentiellement) dès la sortie de vernalisation (**Fig. 2.14A**), contrairement aux flux observés chez Shakira, où les orobanches fixées (au même nombre que sur ES Alienor dans ces conditions de culture) ne prélèvent du ^{15}N remobilisé qu'à partir du stade floraison du colza, l'isotope étant accumulé et maintenu avant cela dans le compartiment foliaire (**Fig. 2.14B**).

3 Discussion

- **Impact de l'infestation par l'orobanche rameuse sur la capacité photosynthétique, l'assimilation et l'allocation de l'azote au sein de la variété très sensible de colza ES Alienor**

Les orobanches se fixent aux racines de colza (var. ES Alienor) précocement et atteignent ainsi un stade de jeunes tubercules à l'entrée de vernalisation (**Fig. 2.11A**). Sous ce scénario d'infestation, observé en pots comme au champ, les plants de colza infestés accumulent moins de biomasses racinaire et foliaire que les plants non-infestés dès la sortie de vernalisation (1 jpp ; **Fig. 2.3**). Cette différence de biomasse est "compensée" par celle du parasite jusqu'à 15 jpp (28 jours post-vernalisation), date à partir de laquelle la biomasse totale de l'interaction est significativement inférieure à celle du colza non-infesté (**Fig. 2.5B**). Ces résultats suggèrent que l'infestation n'influence pas négativement la capacité photosynthétique du colza jusqu'à 15 jpp, et ce en dépit d'une moindre biomasse foliaire. Au-delà, l'inhibition de l'élongation et de la ramification de la tige par l'infestation réduit fortement la surface photosynthétiquement active du colza, et par conséquent la productivité du colza (**Fig. 2.5**).

Bien que les colzas infestés présentent des biomasses racinaire et foliaire inférieures à celles des colzas non-infestés (**Fig. 2.3**), la productivité globale du système est ainsi maintenue jusqu'à 15 jpp. Ce constat suggère la mise en place chez le colza parasité de mécanismes de compensations de la productivité, que ce soit au niveau de l'appareil photosynthétique ou au niveau de l'absorption des nutriments. En effet, un délai d'induction de la sénescence foliaire traduit par une réduction de la biomasse de feuilles mortes 9 et 15 jpp est observée en réponse à l'infestation (**Fig. 2.4**). Ce délai, probablement accompagné d'un ralentissement du déclin de la capacité photosynthétique et d'une augmentation de la surface photosynthétiquement active, comme démontrés dans l'interaction tabac / *O. cernua* (Hibberd *et al.*, 1998), entraîne potentiellement une production de photoassimilats plus importante pouvant expliquer en partie le maintien de la productivité globale du système.

La quantité totale d'azote accumulé au sein de l'interaction est équivalente à celle des colzas non-infestés jusqu'à 30 jpp (43 jours post-vernalisation ; **Fig. 2.7**). Étant donné l'impact négatif de l'infestation sur le développement de l'appareil racinaire du colza (**Fig. 2.3A**), ce résultat traduit une amplification, en réponse à l'infestation, de la capacité d'absorption, mis en lumière par l'expression de la quantité totale de ^{15}N absorbé exprimé par g de matière sèche racinaire (**Fig. 2.8B**). Le même constat a été réalisé chez le tabac en réponse à *O. cernua* (Hibberd *et al.*, 1999). L'absorption de l'azote pourrait dans ce cas être stimulée par l'augmentation du taux de transpiration de l'hôte induit par l'infestation (Jeschke *et al.*, 1997), ou par l'assimilation rapide des nitrates au sein des feuilles en tant que signal azote (Le Ny *et al.*, 2013) et l'utilisation des assimilats non pas par les racines mais par le parasite. Cette spoliation des assimilats azotés pourrait en effet s'opposer au rétrocontrôle négatif de l'absorption par l'accumulation dans le système racinaire d'un pool d'acides aminés (Beuve *et al.*, 2004 ; Fan, 2006 ; Miller *et al.*, 2007 ; Kaur *et al.*, 2010). Nos résultats démontrent le détournement par l'orobanche de la majorité de l'azote foliaire nouvellement absorbé et assimilé par le colza en sortie de vernalisation (**Fig. 2.9B**) et soutiennent ainsi l'hypothèse d'une absence de

rétrocontrôle négatif (par le pool d'azote interne) de l'absorption de l'azote dans les racines de colza en conditions d'infestation, au cours de cette période. Cette hypothèse a d'ailleurs déjà été émise chez *Coleus blumei* en réponse à l'infestation par *Cuscuta reflexa* (Jeschke *et al.*, 1997). En post-floraison, dans nos conditions de culture (fertilisation de l'ordre de 250 kg N ha⁻¹), le colza non-infesté présente une absorption importante d'azote (**Fig. 2.7**). Une telle absorption à ce stade de développement du colza a été également reportée en conditions d'apports sub-optimaux de fertilisants azotés (Schjoerring *et al.*, 1995 ; Gombert *et al.*, 2010). Sous infestation, cette absorption d'azote en post-floraison n'est pas maintenue. L'ensemble de ces résultats révèle un impact significatif de l'infestation sur l'absorption de l'azote tout au long du développement du colza, qu'il conviendrait de mieux caractériser, par exemple par l'analyse comparative de l'activité des transporteurs de nitrates et de la signalétique hormonale en conditions de non-infestation et d'infestation.

Concernant l'assimilation des nitrates en sortie de vernalisation, notre étude révèle une translocation rapide et massive du ¹⁵NO₃ (issu du pulse) absorbé vers le compartiment foliaire du colza non-infesté (**Fig. 2.9**). En conditions d'infestation, ce flux de ¹⁵N nouvellement absorbé vers les feuilles demeure prioritaire. L'infestation ne modifie donc pas l'allocation de l'azote à ce stade chez le colza. L'enrichissement des orobanches en ¹⁵N ultérieurement à celui des feuilles démontre que les orobanches ne détournent pas majoritairement de nitrates via le xylème racinaire du colza hôte, mais prélèvent de l'azote préalablement assimilé dans le compartiment foliaire du colza. Ces résultats corroborent avec les travaux réalisés sur l'interaction tabac / *O. cernua* où 95 % de l'azote dérive du phloème de l'hôte (Hibberd *et al.*, 1999). À ce titre, l'hypothèse de l'incapacité de l'orobanche à assimiler les nitrates peut être avancée, d'autant plus qu'aucune activité nitrate réductase n'a pu être détectée dans les tubercules, à la différence des feuilles du colza hôte.

- **Compétition inter-puits en post-vernalisation chez le colza infesté**

Notre étude démontre qu'à partir de 15 jpp (28 jours post-vernalisation), la croissance des orobanches fixées (**Fig. 2.2**) et les détournements d'azote réduit (**Fig. 2.9**) sont très dommageables pour la poursuite du développement de la variété très sensible ES Alienor. En effet, passé cette date, la distribution de l'azote dans l'interaction est considérablement effectuée au profit des orobanches fixées et ainsi au détriment du développement de la tige et des axes inflorescentiels de l'hôte. La diminution du ratio de biomasse tige/racine est une caractéristique de l'infestation par l'orobanche (Barker *et al.*, 1996). Cette réponse, observée dans notre étude en conditions d'infestation à la fois artificielle (en pot, culture en serre) et naturelle (en champ), est ainsi amplifiée chez cette variété. Dans ce pathosystème, l'orobanche rameuse est un puits surnuméraire dominant qui inhibe totalement, chez l'hôte, la montaison et la ramification de la tige ainsi que le développement de l'appareil reproductif. Cette "dominance parasitaire" vis-à-vis du bourgeon apical du colza hôte repose très probablement en grande partie sur la carence nutritionnelle imposée par la spoliation d'une grande majorité des assimilats par le parasite. En effet, une fois le cycle de développement du parasite terminé, certains pieds de colza parasités réussissent à développer une petite tige (**Fig. 2.15**), signe de la perte de la "dominance parasitaire" vis-à-vis du bourgeon apical du colza hôte. Concernant les

assimilats azotés, nos résultats montrent en effet que, chez cette variété très sensible, l'azote foliaire absorbé en post-vernalisation est rapidement disponible pour les orobanches (**Fig. 2.9**).

La situation est bien évidemment plus complexe. En effet, la compétition inter-puits en post-vernalisation entre les orobanches fixées et les propres puits du colza est régie par la cinétique d'infestation et les stratégies de remobilisation de l'azote du colza, qui varient selon les variétés. Cette information découle des travaux comparatifs effectués entre les variétés ES Alienor et Shakira. Bien que le nombre d'orobanches fixées soit maximal et semblable 13 jours post-vernalisation (0 jpp) pour les deux variétés, la cinétique d'infestation de ces variétés diffère fortement. En effet, le nombre d'orobanches fixées sur ES Alienor est élevé et maximal avant vernalisation alors que la fixation des orobanches se révèle extrêmement limitée avant vernalisation sur Shakira (**Fig. 2.11A**). De plus, une prise importante de biomasse des orobanches fixées sur ES Alienor a lieu pendant la vernalisation et les quelques jours de post-vernalisation précédant le pulse (500 ± 170 mg le jour de la sortie de vernalisation et $1,4 \pm 0,2$ g à 0 jpp ; **Fig. 2.12A**). En conséquence, au temps zéro du pulse, la taille du puits parasitaire est nettement plus importante sur ES Alienor que sur Shakira ($4,9 \pm 0,6$ et $0,6 \pm 0,6$ g MS d'orobanche g^{-1} MS racinaire, respectivement). Cette différence peut expliquer en grande partie la non-compétitivité des orobanches fixées face aux puits propres de Shakira en post-vernalisation jusqu'à 15 jpp, se traduisant par l'absence de prise de biomasse et de prélèvement d'azote foliaire (^{15}N) par les orobanches sur cette période (**Fig. 2.13**). Chez Shakira, l'infestation par l'orobanche n'impacte pas la biomasse de la tige et des feuilles jusqu'à 15 et 30 jpp, respectivement (**Fig. 2.13**). Ces résultats traduisent une allocation de biomasse et une mobilisation de l'azote foliaire (^{15}N) quasi-exclusivement en faveur de la plante hôte jusqu'à 15 jpp. Nous sommes toutefois conscients que la globalisation de l'ensemble des feuilles dans cette étude (par souci de simplification) ne permet pas de visualiser les changements de relations sources/puits au sein du compartiment foliaire, qui pourrait apporter quelques éléments de réponse vis-à-vis du puits formé par les jeunes feuilles. A ce stade de nos connaissances, il nous est également difficile d'exclure l'hypothèse que la variété Shakira puisse développer un mécanisme de défense vis-à-vis de l'orobanche s'exprimant par une inhibition tardive post-fixation du développement du parasite, comme par exemple l'obstruction des tissus conducteurs à l'interface hôte - parasite (El Halmouch, 2004 ; Pérez-de-Luque, 2006 ; Letousey *et al.*, 2007). Des analyses histologiques des racines parasitées de colza var. Shakira nous renseigneraient sur l'existence de telles résistances.

Si un tel mécanisme de défense existe chez Shakira, il se révèle inefficace et temporaire, puisque sur la période de 15 à 30 jpp, une modification importante des relations sources/puits est observée dans l'interaction au profit des orobanches fixées, sans pour autant que leur nombre évolue (**Fig. 2.11A**) se traduisant par une exportation du ^{15}N foliaire vers le puits parasitaire (**Fig. 2.14**) et une prise de biomasse très importante de ce dernier. Il en résulte une inhibition importante de la croissance de la tige inflorescentielle du colza var. Shakira sur cette période et une biomasse de siliques réduite de moitié en fin de culture. Ces résultats montrent l'incapacité du puits inflorescentiel du colza var. Shakira à lutter face aux orobanches fixées. Cette modification « brutale » et importante des relations sources/puits en faveur du puits parasitaire quiescent au moins depuis l'entrée en vernalisation (**Fig. 2.12A**), pose la question de la nature des signaux émis par le colza à ce stade de développement (initiation florale, développement des axes inflorescentiels) et qui activent très fortement le puits

parasitaire. Dans ce contexte, les travaux de Navarro *et al.* (2011) qui démontrent l'implication chez la pomme de terre d'un signal florigène (protéine phloème mobile codée par le gène *StSP6A*) dans l'induction de la tubérisation a retenu notre attention. Ces auteurs montrent que la transition florale et la tubérisation sont contrôlées par deux paralogues des Flowering Loci T - Like différents, répondant à des signaux environnementaux différents (tubérisation en jours courts *versus* floraison en jours longs). A ce titre, la revue de Pin et Nilsson (2012) fait le point sur les travaux récents soulignant les fonctions multiples des Flowering Loci T (FT) chez les plantes. Ainsi les protéines FT sont impliquées dans le contrôle positif ou négatif de la floraison, mais participent aussi à la régulation de bien d'autres processus développementaux, tels que l'ouverture des stomates, la croissance végétative, la dormance des bourgeons, et la tubérisation. À la lumière de ces observations et de nos résultats, l'hypothèse que les signaux FT du colza var. Shakira puissent contrôler fortement l'activité du puits parasitaire est très séduisante, l'inhibant jusqu'à floraison et l'activant à floraison. Cette activation ne serait dans cette hypothèse qu'une conséquence indésirable de la levée d'inhibition de la floraison. Cette hypothèse ouvre de nouvelles perspectives d'études très intéressantes sur le contrôle par le colza du développement de l'orobanche, impliquant des facteurs autres que nutritionnels et hormonaux. En revanche, à notre connaissance, aucune information fonctionnelle n'existe à ce jour sur les différents gènes *FT* du colza, leur contrôle et leur expression au cours du développement, et encore moins sur la variabilité existante au sein de cette famille chez le colza, notamment en fonction de la précocité de floraison. En effet, une telle variabilité pourrait expliquer en partie les différences de comportement des variétés ES Alienor (floraison précoce) et Shakira (floraison semi-précoce) vis-à-vis de l'orobanche, en proposant comme hypothèse d'études que la tolérance de la var. Shakira à l'orobanche puisse reposer sur l'inhibition prolongée de la floraison après vernalisation.

Chapitre 3 : Caractérisation métabolomique de l'interaction *B. napus* / *P. ramosa*

1 Matériels et méthodes

1.1 Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé au sein de ce chapitre est obtenu de façon identique aux protocoles de cultures présentés dans les chapitres 1 et 2. Toutefois, la campagne de co-cultures en pots est réalisée avec un apport plus important en ^{15}N (K^{15}NO_3 2,5 mM, enrichi à 98 %, 200 mL). Les différents compartiments de l'interaction sont récoltés à 3 dates après le pulse effectué en sortie de vernalisation (3, 15 et 30 jpp). Ces échantillons sont congelés dans l'azote liquide puis lyophilisés, avant les analyses SMRI et métabolomiques.

- **Collecte des exsudats phloémiens foliaires**

Les exsudats phloémiens foliaires des plants de colza alimentés en K^{15}NO_3 (2,5 mM, enrichi à 98 %, 200 mL) sont récoltés selon les méthodes décrites par King and Zeevaart (1974) puis Turgeon and Medville (2004), basées sur l'utilisation d'EDTA, inhibiteur de la formation de bouchons de callose, et de PCMBs, inhibiteur des invertases acides extracellulaires et des transporteurs de saccharose impliqués dans le chargement apoplastique du diholoside (Porter *et al.*, 1985; Turgeon and Medville, 2004).

Cette méthode nécessite d'irriguer les plantes au préalable ou de les placer dans une enceinte de culture "HR-regulated" la veille de l'expérimentation, de façon à ce que le taux d'humidité relatif soit important (20-23 °C, HR 70-90 %, héméroperiode de 16h) pour optimiser le statut hydrique des plantes. Il est également nécessaire d'installer la "chambre d'exsudation" dans un phytotron (un simple container en plastique contenant de l'eau et hermétiquement fermé avec un film plastique transparent) afin d'assurer ici aussi un taux d'humidité maximum.

Trois feuilles sources (dans notre cas, les feuilles les plus basales) sont sélectionnées pour chaque plante à 3 et 15 jpp. La première coupe des pétioles est directement effectuée dans la pièce de culture avant transfert rapide des feuilles dans une solution d'EDTA (20 mM, pH = 7) jusqu'au laboratoire. Une seconde coupe plus précise des pétioles est alors réalisée avec une lame de rasoir neuve dans une nouvelle solution d'EDTA. Les pétioles fraîchement coupés sont immergés dans des tubes de 15 mL contenant 5 mL d'une solution aqueuse d'EDTA/PCMBs (20 et 0,5 mM respectivement). Les feuilles sont alors placées pendant une heure à l'obscurité (20 - 23 °C, HR 70 - 90 %), puis rincés à l'eau ultra-pure et insérés dans des tubes de 15 mL contenant 5 mL d'eau ultra-pure. Les tubes, disposés dans un rack, sont introduits dans le container hermétiquement fermé, afin d'assurer le maintien du taux d'humidité. La phase d'exsudation est réalisée à l'obscurité, à 20-23°C durant 20 heures. Une fois l'exsudation terminée, les feuilles et les exsudats phloémiens sont congelés dans l'azote liquide avant d'être lyophilisés puis stockés à -20°C et -80 °C, respectivement, en vue des analyses métabolomiques.

1.2 Analyses métabolomiques

- **Extraction**

Les aminoacides libres, les glucides solubles non-structuraux, les acides organiques et les polyols sont extraits à partir d'environ 10 mg de poudre des différents organes récoltés. Le processus d'extraction méthanol/chloroforme/eau (2/1/2) est scindé en trois étapes entrecoupées de longues périodes d'agitation (15 et 10 minutes respectivement, vibrax 1500 tour min⁻¹ à température ambiante). La première étape d'extraction au méthanol (400 µL) permet d'introduire les deux standards internes nécessaires au calcul du rendement d'extraction pour les analyses par UPLC-PDA et GC-FID, soit l'acide β-aminobutyrique (BABA) et l'adonitol (200 µM et 400 µM dans le méthanol respectivement). La séparation des différentes phases est obtenue par centrifugation (5 min, 12000 g, 15 °C). Un volume déterminé (100 µL pour les analyses par UPLC et 50 µL pour celle par GC-FID) de la fraction polaire obtenue (méthanol/eau) est alors évaporé (évaporateur rotatif, 2h, 35 °C) avant d'être stocké à - 80 °C en vue des analyses.

Les exsudats phloëmiens lyophilisés ne nécessitent pas d'étape d'extraction proprement dit, mais seulement d'être repris dans 1 mL d'eau ultra-pure contenant les standards internes précédemment cités.

Les glucosinolates sont extraits à partir d'environ 5 mg de poudre de tissus lyophilisés. Le processus d'extraction consiste en l'ajout d'1 mL de méthanol (+ 0,1 % acide formique) contenant le standard interne (glucotropaeoline) suivi d'une étape de sonication (5 min) et de filtration (filtre seringue téflon / PVDF). Les extraits obtenus sont conservés à - 80 °C en vue des analyses.

- **Analyse des aminoacides par UPLC-PDA**

L'analyse des profils métabolomiques des différents aminoacides est effectuée à l'aide du kit AccQ•Tag® de chez Waters (Waters Corporation, Milford, MA, USA) basé sur l'utilisation d'un chromophore, le 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (6-AQC), pour la dérivation chimique des fonctions amines (Cohen, 2000, 2003).

Les résidus secs obtenus après extraction sont repris dans 50 µL d'eau ultra-pure avant d'être pris en charge par le système analytique (injection d'1 µL). La séparation chromatographique est réalisée à l'aide d'un système ACQUITY UPLC (Waters) équipé d'une colonne BEH C₁₈ (2,1 mm x 100 mm, 1,7 µm, Waters) couplée à une précolonne BEH C₁₈ (2,1mm x 5 mm, 1,7 µm, Waters) chauffées à 55 °C, en utilisant comme éluant A une dilution au 1/10^{ème} de l'AccQ•Tag Ultra Eluent A, et comme éluant B de l'acétonitrile, suivant le gradient non-linéaire au débit de 0,7 mL min⁻¹ : initial (99,9 % A) ; 0,54 min (99,9% A, courbe 6) ; 6,50 min (90,9% A, courbe 7) ; 8,50 min (78,8% A, courbe 6) ; 8,90 min (40,4% A, courbe 6) ; 9,50 min (40,4%, courbe 6) ; 9,60 min (99,9% A, courbe 6) ; 10,10 min (99,9% A, courbe 6). La détection et

la quantification sont réalisées à l'aide d'un détecteur à barrettes de diodes PDA (PhotoDiode Array) et du logiciel Empower GPC Software (Waters, plateforme P₂M₂, INRA du Rheu).

L'identité des différents aminoacides est confirmée par comparaison de leur temps de rétention avec ceux de standards synthétiques (solution d'acides aminés standards complétée des acides aminés d'intérêt, Sigma-Aldrich). Leur quantification est effectuée à l'aide de courbes de calibration externes (une fois tous les dix échantillons), en faisant référence au signal du standard interne et au poids de l'échantillon sec (expression des données en $\mu\text{mol g}^{-1}$ de matière sèche). Les profils obtenus après analyse des exsudats phloémiens foliaires sont exprimés en $\mu\text{mol g}^{-1}$ de matière sèche foliaire du fait de la difficulté d'obtention de la masse de matériel exsudé.

- **Analyse des ¹⁵N-aminoacides par AccQ•Tag UPLC-PDA-ESI-MS**

Ces analyses nécessitent le développement d'une méthode AccQ•Tag UPLC-PDA-ESI-MS (plateforme P₂M₂, INRA du Rheu) décrite au sein de l'article inséré dans ce chapitre.

- **Analyse des glucides solubles non-structuraux, polyols et acides organiques par GC-FID**

Les analyses sont réalisées par GC-FID, d'après Adams *et al.*, (1999) et Lugan *et al.*, (2009). Les résidus secs obtenus après extraction et préalablement repris dans 50 μL d'eau ultra-pure, sont dérivés par triméthylsilylation afin d'augmenter leur capacité d'ionisation et de volatilisation. La séparation et la quantification sont effectuées à l'aide d'un système de chromatographie gazeuse "Trace 2000 series" couplé à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID; Thermo-Fisher Scientific, Waltham, CA, USA; plateforme P₂M₂, INRA du Rheu). L'identité des différents composés est confirmée par comparaison de leur temps de rétention avec ceux de standards synthétiques. Leur quantification a été effectuée à l'aide de courbes de calibration externes (une fois tous les dix échantillons), en faisant référence au signal du standard interne et au poids de l'échantillon sec (expression des données en $\mu\text{mol g}^{-1}$ de matière sèche). Les composés non-identifiés sont quantifiés en utilisant l'aire moyenne des composés chromatographiés comme référence.

- **Analyse des glucosinolates par UPLC-ESI-MS/MS**

Les analyses sont effectuées par UPLC-ESI-MS/MS (UPLC Acquity couplée à un détecteur quadripôle en tandem TQD muni d'une source ZsprayTM, Waters Corporation, Milford MA, USA; plateforme P₂M₂, INRA du Rheu). La détection des ions non-fragmentés est effectuée en mode SIR, et leur quantification est réalisée à l'aide de courbes de calibration externes en faisant référence au signal du standard interne (la glucotropaeoline) et au poids de l'échantillon sec (expression des données en $\mu\text{mol g}^{-1}$ de matière sèche).

- **Analyse statistique des données**

Les analyses de variance (ANOVA) sont réalisées en utilisant en modèle linéaire généralisé à l'aide des logiciels SigmaPlot version 10.0 et SigmaStat version 3.5 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA), suivi par une comparaison multiple de moyennes à l'aide du test SNK ou de la méthode Holm-Sidak ($P < 0,05$).

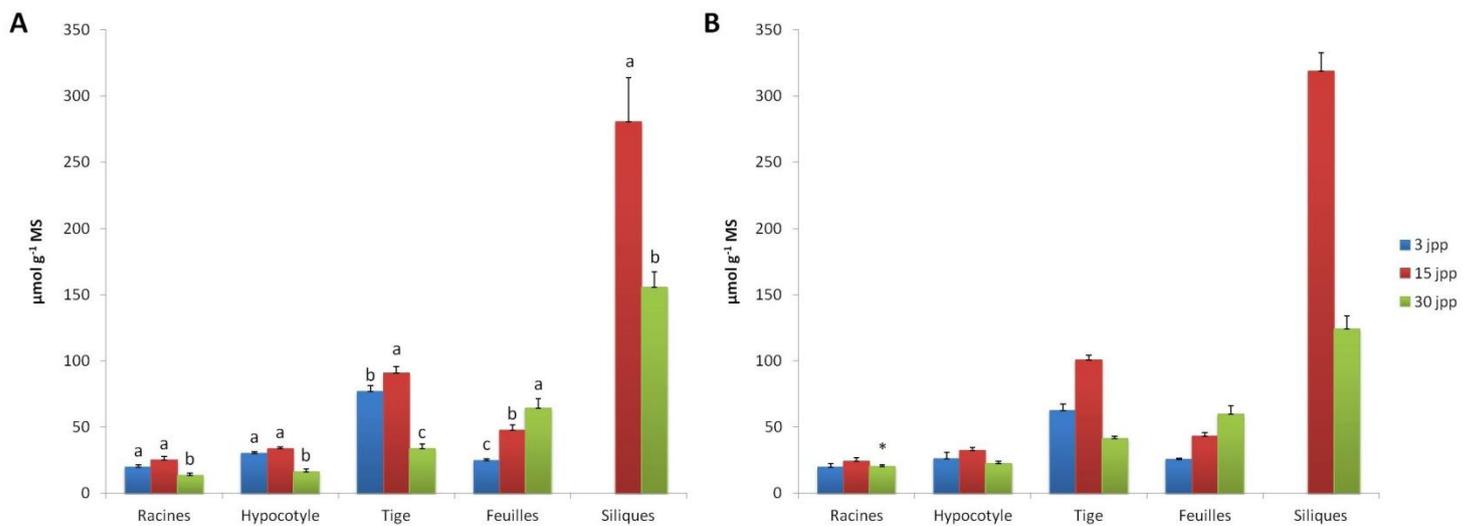


Figure 3.1 : Évolution de la teneur globale en aminoacides libres dans différents organes de colza (variété sensible ES Alienor) en conditions de non-infestation (A) et d'infestation par l'orobanche rameuse (B). Cultures en serre alimentées en K^{15}NO_3 (2,5 mM, enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de LiquoplantTM FD 134 Hiver 3 %. Les teneurs en aminoacides libres sont exprimées en $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS ($n = 6$, moyennes \pm SE ; ANOVA, $P < 0,05$ entre les différentes dates d'échantillonnage, test SNK ; * $P < 0,05$, infesté versus non-infesté, t -test). jpp, jours post-pulse.

2 Résultats

- **Préambule**

Cette expérimentation (pulse de $K^{15}NO_3$ 2,5 mM) n'a été réalisée qu'une seule fois, avec l'enregistrement de température anormalement élevées en sortie de vernalisation (fin de printemps 2011). En effet, pour des raisons techniques, une remontée progressive de la température en fin de vernalisation n'a pas pu être réalisée. Les conditions d'ensoleillement exceptionnelles ($24,1 \pm 2,8$ °C tout au long du mois d'expérimentation) ont fortement accéléré la croissance du colza post-vernalisation. En conditions de non-infestation, les plantes ont atteint les stades D, G1 à G2 (fin de floraison - début de formation des siliques) et G3 à G5 (remplissage des graines) à 3, 15 et 30 jpp, respectivement, soit une précocité de 12, 15 et 20-30 jours par rapport aux deux séries de culture précédentes (pulse $K^{15}NO_3$ de 250 μM). En conditions d'infestation, les orobanches ont émergé plus tardivement, entre 15 et 30 jpp, pour fleurir uniquement à 30 jpp, soit un retard de développement de 4-5 jours par rapport aux deux séries de culture précédentes. Le degré d'infestation du colza fut semblable dans ces conditions, avec un nombre et une biomasse d'orobanches fixées en sortie de vernalisation (3 jpp) du même ordre de grandeur ($10,3 \pm 3,7$ versus $14,3 \pm 5,2$ orobanches fixées ; $1,9 \pm 0,8$ versus $2,0 \pm 0,3$ g MS d'orobanche fixées dans cette série et les deux précédentes, respectivement). Par contre, l'infestation s'est avérée moins dommageable pour la plante hôte, qui a réussi dans ces conditions à développer une tige, des rameaux secondaires, des fleurs et des siliques. L'infestation n'a pas impacté le développement des siliques (nombre semblable de siliques par plant par rapport aux deux séries de culture précédentes), mais celui des graines, avec en effet une augmentation significative à 30 jpp de 20 % du nombre de siliques vides (graines avortées) par plante infestée par rapport aux plantes non-infestées. Cette expérimentation a été réalisée dans l'objectif d'identifier les principales formes azotées prélevées par l'orobanche chez le colza et d'étudier leur métabolisation chez le parasite. En dépit de ces conditions de culture différentes en sortie de vernalisation, les analyses métabolomiques et isotopiques ont tout de même été réalisées sur ces échantillons. Les résultats obtenus seront discutés en tenant compte de ces conditions.

2.1 Analyse des pools d'acides aminés des différents organes du colza (variété ES Alienor) et de l'orobanche rameuse

2.1.1 Caractérisation des pools d'acides aminés libres du colza

- **Acides aminés libres totaux**

En conditions de non-infestation et en cours de montaison (3 jpp), les tiges du colza accumulent des acides aminés libres (AAL, $\mu mol g^{-1} MS$) 3,9, 2,6 et 3,1 fois plus que les racines,

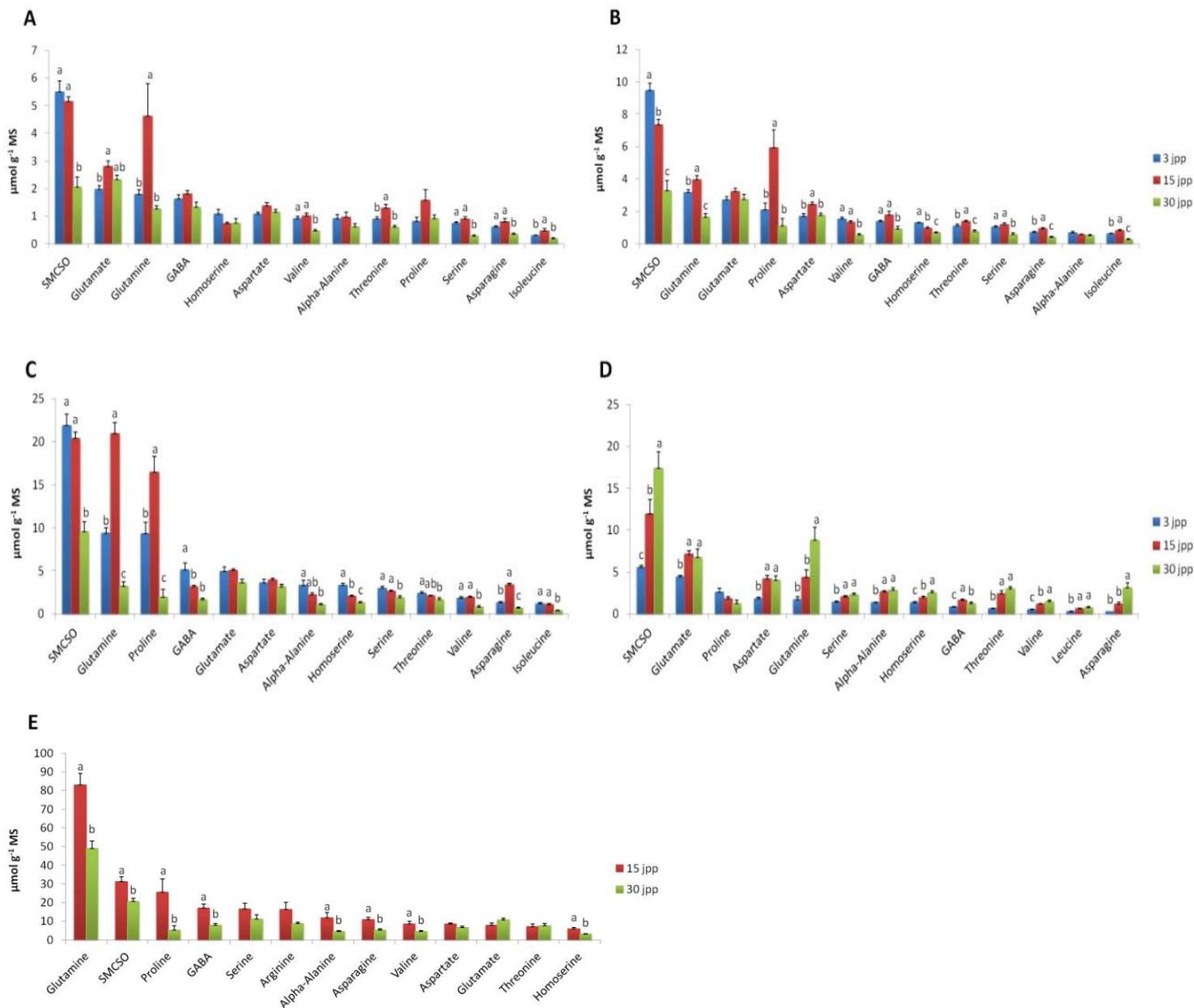


Figure 3.2 : Évolution du profil des principaux aminoacides libres dans différents organes de colza (variété sensible ES Alienor) en conditions de non-infestation. Cultures en serre alimentées en K^{15}NO_3 (2,5 mM, enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de Liquoplant™ FD 134 Hiver 3 ‰. Racines (A), hypocotyle (B), tige (C), feuilles (D) et siliques (E). Les teneurs en aminoacides libres sont exprimées en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$ ($n = 6$, moyennes \pm SE). jpp, jours post-pulse.

l'hypocotyle et les feuilles, respectivement (**Fig. 3.1A**). À 15 jpp (fin de floraison - début de formation des siliques), les tiges et les feuilles en phase de sénescence monocarpique accumulent davantage d'AAL. Les racines et l'hypocotyle ne montrent par contre aucune variation de leur pool d'AAL sur cette période de mobilisation vers les siliques. À 15 jpp, les siliques en formation sont en effet le compartiment d'accumulation principal des AAL, avec une teneur globale 11,2, 8,4, 3,1 et 5,9 fois plus élevée que celle des racines, de l'hypocotyle, de la tige et des feuilles, respectivement. À 30 jpp, durant la phase de remplissage des graines, les pools d'AAL des racines, de l'hypocotyle et des tiges diminuent significativement, alors que celui des feuilles encore en place et en fin de sénescence, continue à augmenter. À ce stade de développement avancé, les siliques restent le compartiment principal d'accumulation des AAL, même si leur teneur globale diminue quasiment de moitié comparée à 15 jpp. Cette diminution est probablement à mettre en lien avec la synthèse des protéines de stockage dans les graines.

Dans ces conditions de culture, l'infestation impacte peu les teneurs globales en AAL du colza (**Fig. 3.1B**). En effet, seules les racines à 30 jpp présentent une légère augmentation du pool d'AAL. Ainsi, à 30 jpp, les graines, en nombre réduit comparé au colza non-infesté, n'accumulent pas davantage d'AAL.

- **Profils d'acides aminés libres**

L'évolution en post-vernalisation des profils d'AAL des différents organes du colza non-infesté est présentée en détails dans l'annexe **tableau I**. Pour une meilleure lisibilité, l'évolution du profil des principaux AAL est présentée sous forme de graphique (**Fig. 3.2**).

Dans tous les organes, le SMCSO est l'un des AAL majoritairement accumulé tout au long du cycle de développement du colza. Il représente ainsi de 11,8 à 31,8 % des AAL totaux, tous organes confondus. À 30 jpp, une nette diminution de la teneur de cet AAL est observée dans tous les organes hormis les feuilles sénescentes qui l'accumulent davantage. Ces résultats suggèrent que ce composé ou un produit de son catabolisme joue un rôle important dans la remobilisation conjointe de l'azote et du soufre au cours du remplissage des graines.

Parallèlement, la Gln, le Glu, la Pro et le GABA sont les autres AAL majeurs du colza, avec des proportions respectives variables selon l'organe. À 15 jpp (période de remobilisation et de formation des siliques), deux d'entre eux, la Gln et la Pro, présentent une forte augmentation. Un pic d'accumulation de Gln est ainsi observé dans les racines et la tige (**Fig. 3.2A et C**), alors qu'un pic d'accumulation de Pro est visible dans l'hypocotyle et la tige (**Fig. 3.2B et C**). Par ailleurs, ces deux AAL sont abondants dans les siliques à 15 jpp (**Fig. 3.2E**), et semblent donc jouer un rôle important, avec le SMCSO, dans la remobilisation de l'azote vers les siliques.

Le profil en AAL majeurs des feuilles évolue spécifiquement au cours de la culture (**Fig. 3.2D**). En effet, tous ces composés, hormis la Pro, s'accumulent des feuilles à 30 jpp, l'augmentation la plus importante étant observée pour le SMCSO et la Gln, probablement en lien avec leur fonction supposée de transporteurs majoritaires d'azote longue-distance vers les siliques.

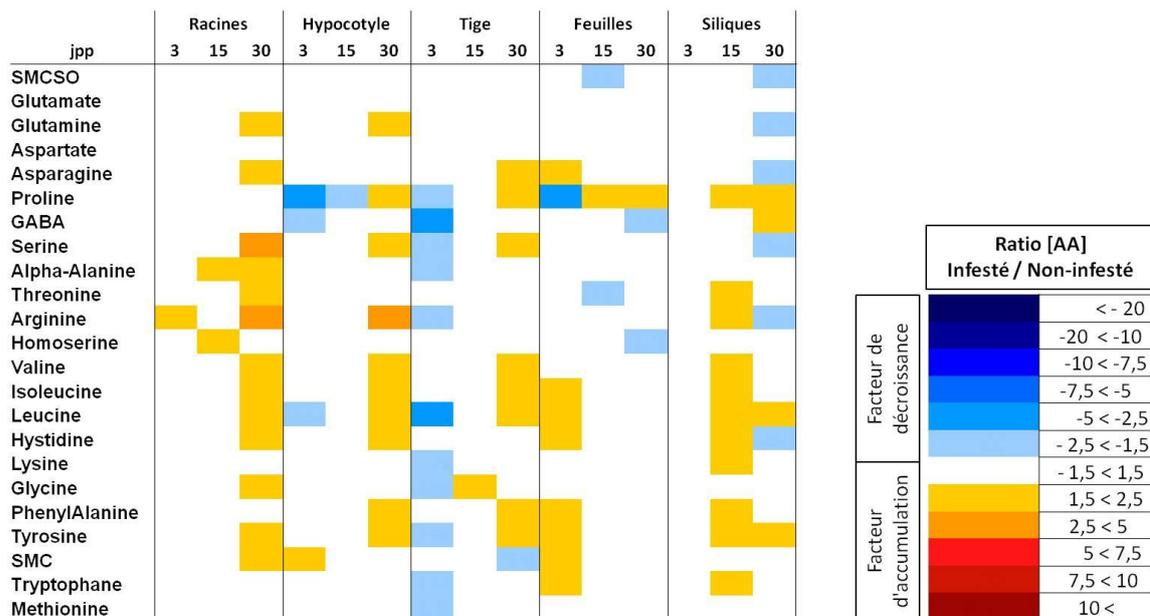


Figure 3.3 : Impact de l'infestation par l'orobanche rameuse sur les pools d'acides aminés libres des différents organes de colza (variété sensible ES Alienor). Cultures en serre alimentées en $K^{15}NO_3$ (2,5 mM, enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de LiquoplantTM FD 134 Hiver 3 ‰. Les résultats sont exprimés en \log_2 du ratio des teneurs en acides aminés libres ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MS) en conditions d'infestation *versus* de non-infestation. jpp, jours post-pulse.

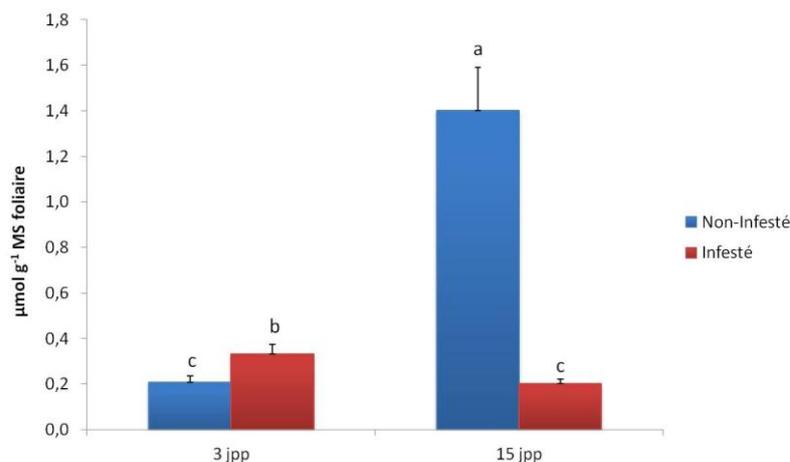


Figure 3.4 : Teneur globale en acides aminés libres des exsudats phloémiques foliaires de colza (variété sensible ES Alienor) en conditions de non-infestation et d'infestation par l'orobanche rameuse. Cultures en serre alimentées en $K^{15}NO_3$ (2,5 mM, enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de LiquoplantTM FD 134 Hiver 3 ‰. Les teneurs en acides aminés libres sont exprimées en $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS foliaire (n = 18 et 12 pour les 3 jpp et 15 jpp respectivement, moyennes \pm SE; ANOVA, $P < 0,05$ entre les différents points, test SNK). jpp, jours post-pulse.

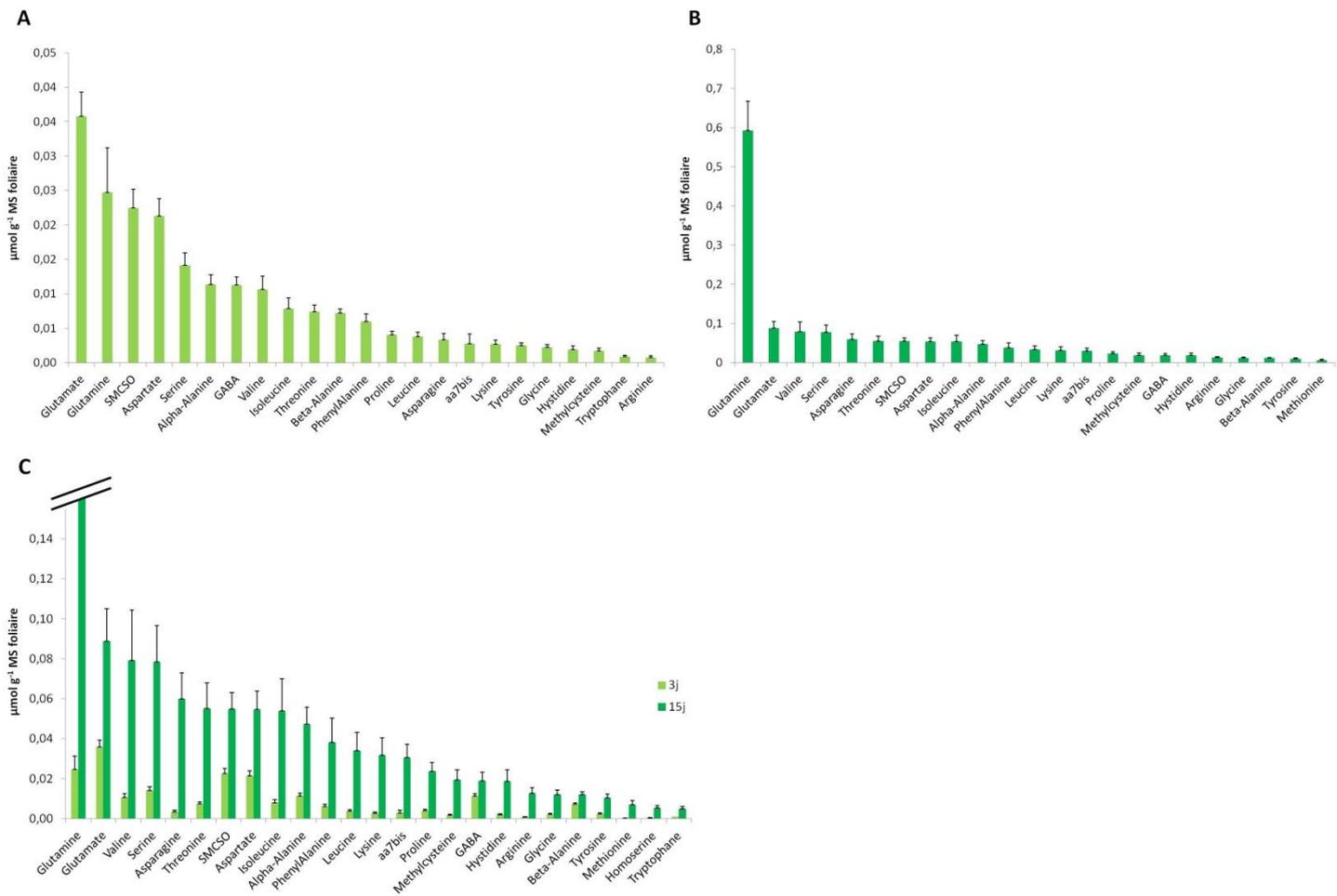


Figure 3.5 : Évolution du profil des principaux aminoacides libres dans les exsudats phloëmiens foliaires de colza (variété sensible ES Alienor) en conditions de non-infestation. Cultures en serre alimentées en $K^{15}NO_3$ (2,5 mM, enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de LiquoplantTM FD 134 Hiver 3 %. 3 jpp (A), 15 jpp (B). Comparatif des deux dates d'échantillonnage en zoom (C). Les teneurs en aminoacides libres sont exprimées en $\mu mol g^{-1} MS$ foliaire ($n = 18$ et 12 pour 3 jpp et 15 jpp, respectivement, moyennes $\pm SE$).

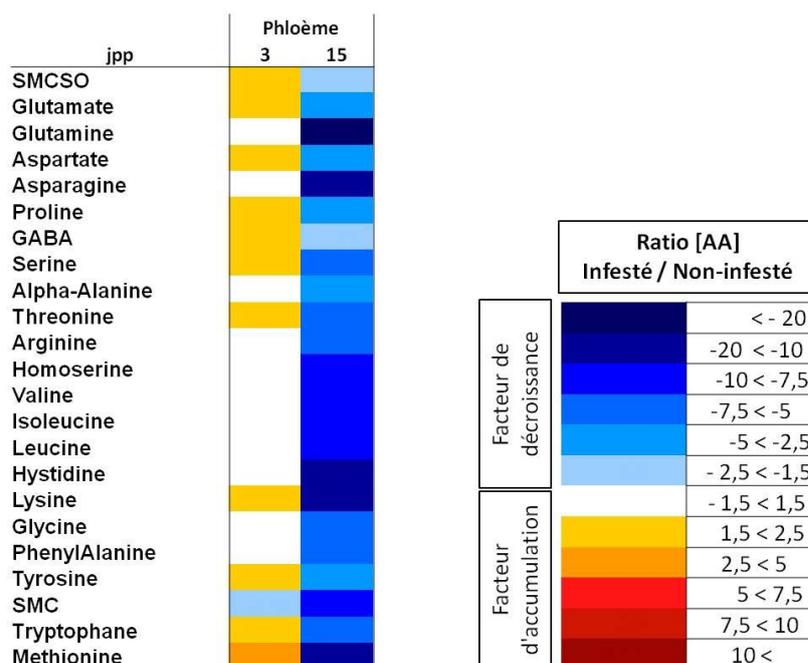


Figure 3.6 : Impact de l'infestation par l'orobanche rameuse sur les pools d'acides aminés libres des exsudats phloémiens foliaires de colza (variété sensible ES Alienor). Cultures en serre alimentées en $K^{15}NO_3$ (2,5 mM, enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de Liquoplant™ FD 134 Hiver 3 ‰. Les résultats sont exprimés en \log_2 du ratio des teneurs en acides aminés libres ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MS foliaire) en conditions d'infestation *versus* non-infestation. jpp, jours post-pulse.

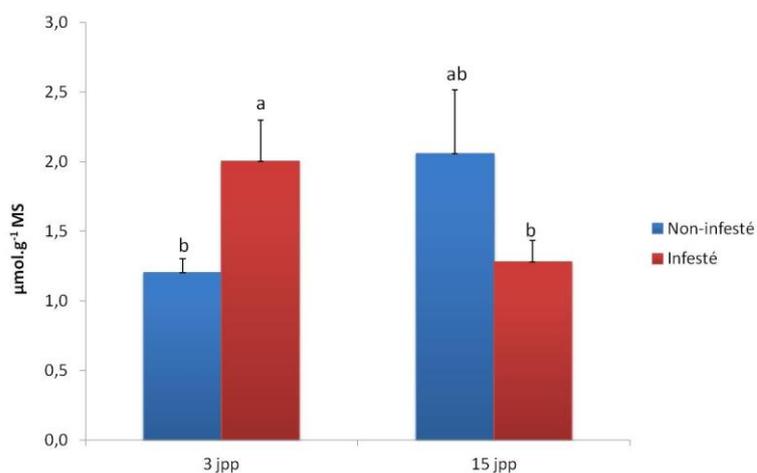


Figure 3.7 : Impact de l'infestation par l'orobanche rameuse sur la teneur globale en sucres, polyols et acides organiques des exsudats phloémiens foliaires de colza (variété sensible ES Alienor). Cultures en serre alimentées en $K^{15}NO_3$ (2,5 mM, enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de Liquoplant™ FD 134 Hiver 3 ‰. Les teneurs en acides aminés libres sont exprimées en $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS foliaire ($n = 18$ et 12 pour 3 jpp et 15 jpp, respectivement, moyennes \pm SE; ANOVA, $P < 0,05$ entre les différents points, test SNK). jpp, jours post-pulse.

Le tableau de chaleur présenté **figure 3.3** donne une vue d'ensemble de l'impact de l'infestation sur le pool d'AAL des différents organes du colza à 3, 15 et 30 jpp. Ces résultats montrent que, dans ces conditions de culture, l'infestation ne provoque pas de changement drastique du profil des AAL du colza. Aucun pool majeur d'AAL ne présente de modification critique. À 3 jpp, l'infestation impacte essentiellement les pools d'AAL de la tige et des feuilles, la tige étant l'organe le plus impacté avec une diminution globale de la teneur d'un grand nombre d'AAL, notamment du GABA ($5,11 \pm 0,79$ versus $1,78 \pm 0,28 \mu\text{mol g}^{-1}$ MS) et de la Pro ($9,30 \pm 1,34$ versus $4,30 \pm 0,98 \mu\text{mol g}^{-1}$ MS). Dans les feuilles, l'infestation induit une légère accumulation de plusieurs AAL à 3 jpp, bien que la variation notable à ce stade soit une diminution importante de la teneur en Pro ($2,59 \pm 0,49$ versus $0,98 \pm 0,28 \mu\text{mol g}^{-1}$ MS). À 15 jpp, l'infestation induit une diminution de la teneur en SMCSO dans les feuilles ($11,94 \pm 1,68$ versus $7,15 \pm 0,60 \mu\text{mol g}^{-1}$ MS). À 30 jpp, l'infestation s'accompagne d'une légère accumulation de plusieurs AAL dans les racines, l'hypocotyle et la tige. L'impact de l'infestation sur le profil des AAL des siliques diffère de celui observé dans les organes par une accentuation à 15 jpp de la teneur en Pro ($5,22 \pm 2,34$ versus $12,02 \pm 1,95 \mu\text{mol g}^{-1}$ MS) et d'un grand nombre d'AAL mineurs, et par une réduction à 30 jpp du pool de SMCSO ($20,68 \pm 1,55$ versus $11,86 \pm 1,89 \mu\text{mol g}^{-1}$ MS) et de Gln ($48,87 \pm 4,22$ versus $29,24 \pm 4,82 \mu\text{mol g}^{-1}$ MS) alors qu'une légère accumulation de GABA et de Pro est observée ($7,75 \pm 1,02$ versus $12,52 \pm 0,45 \mu\text{mol g}^{-1}$ MS, $5,22 \pm 2,34$ versus $12,02 \pm 1,95$, respectivement).

2.1.2 Métabolomique des exsudats phloëmiens foliaires du colza (variété ES Alienor)

- **Préambule**

Les quantités de matière exsudée sont exprimées en $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS foliaire, puisqu'il a été impossible d'obtenir une mesure précise de la masse de matière exsudée. Aucun prélèvement d'exsudats n'a été effectué à 30 jpp du fait de l'absence de feuilles sources basales à ce stade avancé de développement du colza. Les exsudats ont été prélevés à partir des deux-trois derniers rangs de feuilles basales de la tige, supposées sources pour les racines et les orobanches fixées.

- **Aminoacides libres**

En conditions de non-infestation, une très forte augmentation (6,8 fois) de la teneur globale en AAL des exsudats phloëmiens est observée entre 3 et 15 jpp (**Fig. 3.4**), reflétant une intensification de l'exportation phloémienne foliaire de ces composés à 15 jpp chez le colza en cours de fructification (formation des siliques). À 3 jpp, le profil des AAL des exsudats phloëmiens n'est pas caractérisé par un ou quelques AAL majoritaires, mais par un pool assez large d'AAL, même si la Glu, la Gln, le SMCSO et l'Asp sont en quantité légèrement supérieure aux autres AAL (**Fig. 3.5A**). À 15 jpp, une augmentation générale de la teneur de chaque AAL est observée, avec néanmoins un très fort enrichissement des exsudats phloëmiens en Gln (24 fois) et en Asn (18 fois). La Gln est ainsi l'AAL largement majoritaire à 15 jpp. Ce résultat atteste du

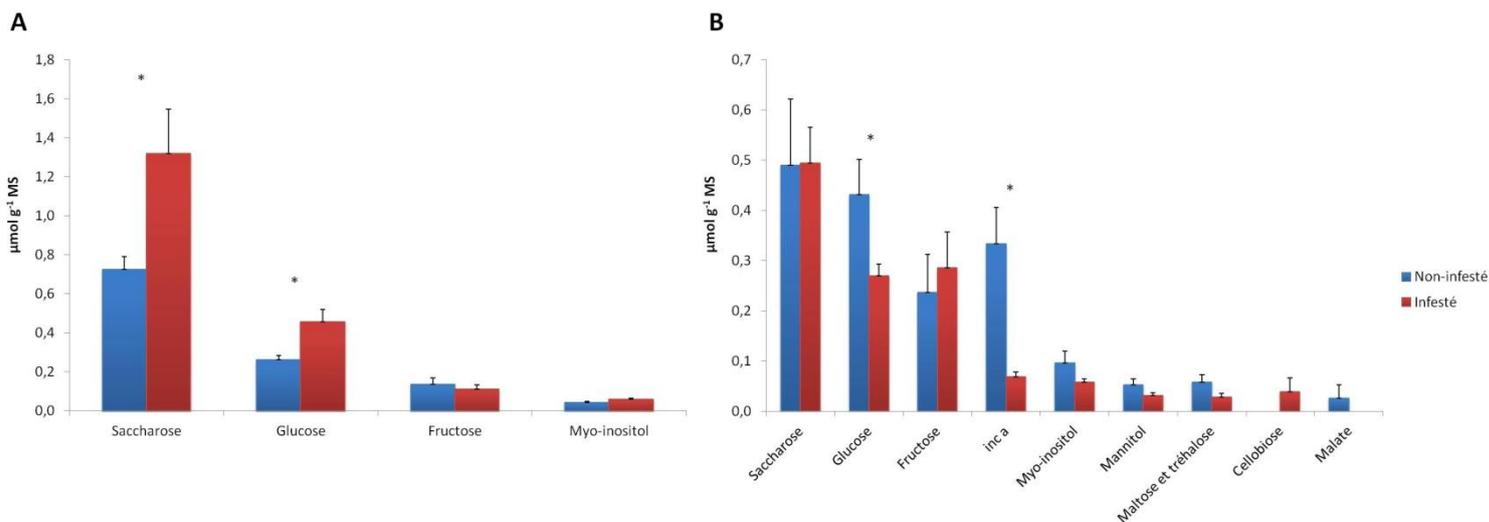


Figure 3.8 : Impact de l'infestation par l'orobanche rameuse sur le profil des principaux glucides, polyols et acides organiques des exsudats phloémiens foliaires de colza (variété sensible ES Alienor), à 3 jpp (A) et 15 jpp (B). Cultures en serre alimentées en K^{15}NO_3 (2,5 mM, enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de LiquoplantTM FD 134 Hiver 3 %. Les teneurs sont exprimées en $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS foliaire ($n = 18$ et 12 pour 3 jpp et 15 jpp, respectivement, moyennes \pm SE, ANOVA, * $P < 0,05$ non-infesté *versus* infesté, *t*-test).

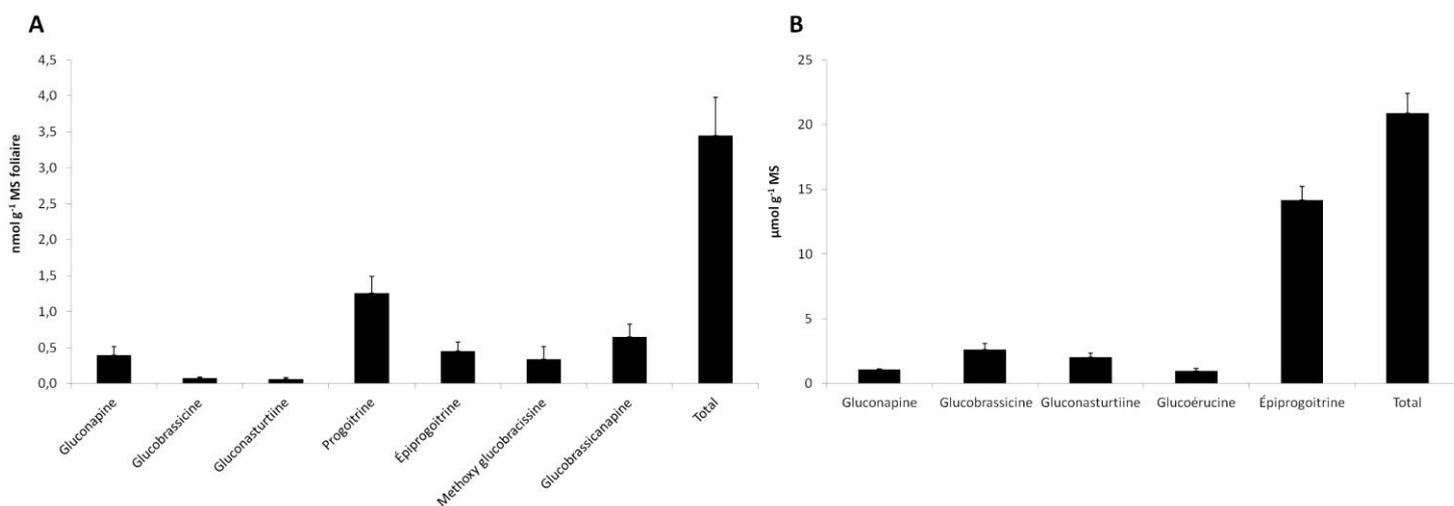


Figure 3.9 : Composition en glucosinolates des exsudats phloémiens foliaires de colza (variété sensible ES Alienor) en conditions d'infestation par l'orobanche rameuse (A) et des tubercules d'orobanche rameuse (B), à 3 jpp. Cultures en serre alimentées en K^{15}NO_3 (2,5 mM, enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de LiquoplantTM FD 134 Hiver 3 %. Les teneurs sont exprimées en nmol g^{-1} MS foliaire ($n = 6$, moyennes \pm SE).

rôle majeur de cet AAL à 15 jpp en tant que transporteur d'azote longue-distance préférentiel chez le colza (**Fig. 3.5B et C**).

L'infestation impacte fortement l'exsudation phloémienne à partir des feuilles sources basales du colza puisqu'aucun enrichissement de la teneur globale en AAL n'est observé chez le colza parasité à 15 jpp (**Fig. 3.4**). Au contraire, à 3 jpp, l'infestation s'accompagne d'un doublement du taux d'AAL.

Le tableau de chaleur présenté **figure 3.6** donne une vue d'ensemble de l'impact de l'infestation sur le profil des AAL des exsudats phloémiens foliaires du colza. À 3 jpp, l'infestation provoque une légère augmentation d'un facteur d'ordre deux de la teneur de nombreux AAL. Par contre, une diminution drastique de la teneur de tous les AAL est observée à 15 jpp, et principalement de la Gln (27,9 fois), de l'Asn et de la Lys (10,5 fois). Ces résultats montrent que l'infestation induit une inhibition importante du flux d'azote remobilisé à partir des feuilles basales du colza durant la période de fin de floraison et de début de formation des siliques.

- **Glucides, polyols et acides organiques**

En conditions de non-infestation, les exsudats phloémiens des feuilles sources basales contiennent à 3 jpp environ 6 fois plus de glucides que d'AAL (**Fig. 3.4 et 3.7**), avec à ce stade une très large représentativité du saccharose en tant que glucide exporté (**Fig. 3.8**). Le glucose et le fructose détectés proviennent potentiellement d'une hydrolyse artefactuelle du saccharose exsudée par une invertase pariétale (malgré l'utilisation de PCMBs). Aucune trace d'acides organiques n'a été détectée à ce stade. La composition glucidique des exsudats phloémiens se révèle donc très simple à 3 jpp. À 15 jpp, les exsudats s'enrichissent d'un facteur d'ordre deux de glucides et de polyols (**Fig. 3.7**), ces composés restant majoritaires vis-à-vis des AAL (**Fig. 3.4 et 3.7**). La composition des exsudats phloémiens se complexifie à 15 jpp, avec la présence, en plus de saccharose et de myo-inositol, d'un composé inconnu (inc a), de mannitol et de maltose ou de tréhalose (**Fig. 3.8**). Des traces de malate sont également détectées.

L'impact de l'infestation sur la teneur globale des glucides, polyols et acides organiques des exsudats phloémiens foliaires du colza est de même nature que celui observé sur le pool des AAL, mais de plus faible amplitude à 15 jpp (**Fig. 3.4 et 3.7**). En effet, comme pour les AAL, l'infestation s'accompagne d'une augmentation d'ordre deux de la teneur globale des glucides, polyols et acides organiques (saccharose essentiellement) mais d'une diminution uniquement d'ordre deux à 15 jpp. L'infestation modifie en parallèle le profil des glucides, polyols et acides organiques des exsudats à 15 jpp, avec une nette diminution de la teneur du composé non identifié Inc a et la détection de traces de cellobiose.

- **Glucosinolates**

Ces analyses sont préliminaires puisque seuls les exsudats phloémiens foliaires récoltés à 3 jpp en conditions d'infestation ont été analysés à ce jour. Ces exsudats contiennent principalement de la progoitrine (36,4 % des glucosinolates totaux), de la glucobrassicinapine

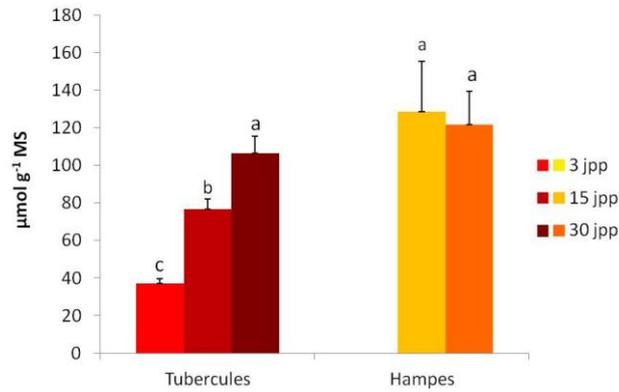


Figure 3.10 : Évolution de la teneur globale en aminoacides libres des tubercules et hampes florales de l'orobanche rameuse parasitant le colza (variété sensible ES Alienor). Cultures en serre alimentées en $K^{15}NO_3$ (2,5 mM, enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de Liquoplant™ FD 134 Hiver 3 ‰. Les teneurs en aminoacides libres sont exprimées en $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS ($n = 6$, moyennes \pm SE; ANOVA, $P < 0,05$ entre les différents points, test SNK). jpp, jours post-pulse.

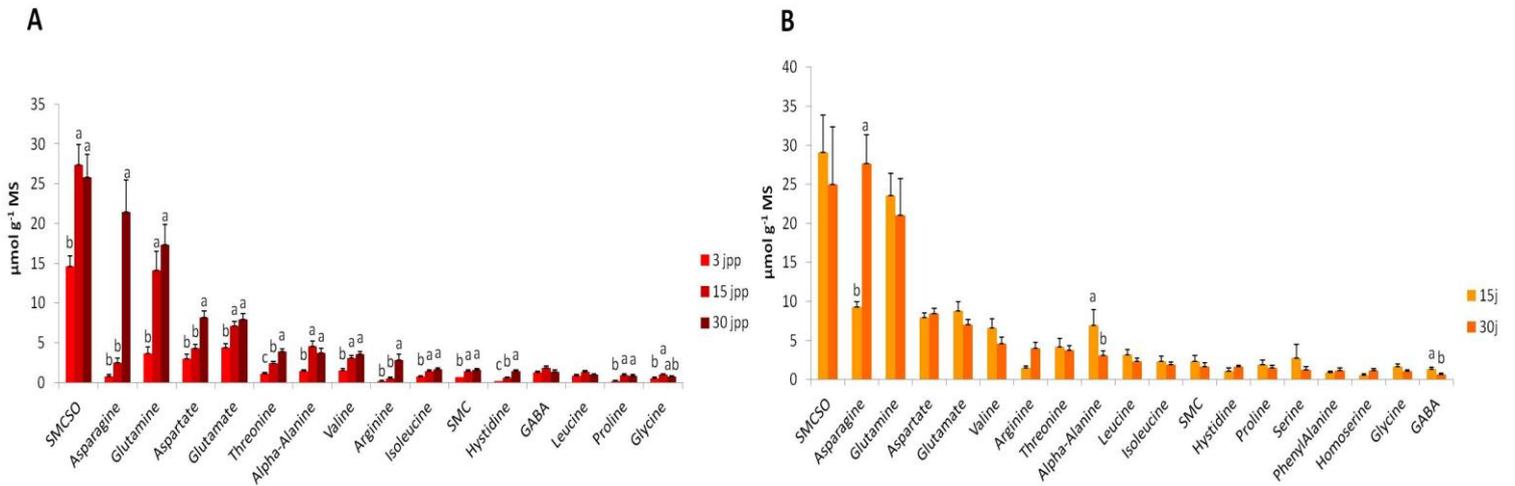


Figure 3.11 : Évolution du profil des principaux aminoacides libres des tubercules (A) et hampes florales (B) de l'orobanche rameuse parasitant le colza (variété sensible ES Alienor). Cultures en serre alimentées en $K^{15}NO_3$ (2,5 mM, enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de Liquoplant™ FD 134 Hiver 3 ‰. Les teneurs en aminoacides libres sont exprimées en $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS ($n = 6$, moyennes \pm SE, ANOVA, $P < 0,05$ entre les différents dates d'échantillonnage, test SNK). jpp, jours post-pulse.

(18,8 %), de l'épiprogoitrine (13,1 %), de la gluconapine (11,3 %), de la méthoxyglucobrassicine (9,7 %), de la glucobrassicine (2,2 %) et de la gluconasturtiine (1,9 %; **Fig. 3.9A**). Les GLS sont par ailleurs très nettement minoritaires à ce stade par rapport aux AAL et glucides, polyols et acides organiques.

2.1.3 Métabolomique de l'orobanche rameuse

- **Aminoacides libres totaux**

Les tubercules présentent une accumulation croissante d'AAL au cours de leur développement, passant de $37,01 \pm 2,58$ à $106,37 \pm 9,14 \mu\text{mol g}^{-1}$ MS entre 3 et 30 jpp, alors que l'accumulation des AAL est maximale dans les hampes florales dès 15 jpp ($128,7 \pm 27,0 \mu\text{mol g}^{-1}$ MS ; **Fig. 3.10**).

Quel que soit leur stade de développement, les tubercules accumulent majoritairement du SMCSO, de la Gln, de l'Asp et du Glu, qui représentent environ 70 % des AAL à 3 et 15 jpp (**Fig. 3.11A**). Le profil en AAL est néanmoins fortement modifié à 30 jpp, avec une augmentation significative de la teneur en Arg, Asp, mais surtout en Asn ($21,44 \pm 3,99 \mu\text{mol g}^{-1}$ MS). La Gln, l'Asn et l'Arg sont des aminoacides à ratio N/C élevé. Ces AAL participent ainsi efficacement au stockage de l'azote remobilisé du colza hôte.

Le profil en AAL des hampes florales est semblable à celui des tubercules et évolue de façon identique au cours de la culture, avec une augmentation à 30 jpp du pool d'Arg et surtout d'Asn ($27,6 \pm 3,7 \mu\text{mol g}^{-1}$ MS ; **Fig. 3.11B**).

- **Glucides, polyols et acides organiques**

Les tubercules, et surtout les hampes florales, accumulent bien plus de glucides, polyols et acides organiques que d'AAL, et ce à tout stade de développement (**Fig. 3.10 et 3.12**). A l'instar des AAL, les glucides, polyols et acides organiques s'accumulent de plus en plus dans les tubercules de 3 à 30 jpp, alors que leur teneur est maximale dans les hampes florales dès 15 jpp (**Fig. 3.12**).

Le profil en glucides, polyols et acides organiques des tubercules évolue peu entre 3 et 30 jpp, et souligne une forte accumulation de malate, de mannitol et d'hexoses (fructose et glucose) dans ces organes (**Fig. 3.13A**). La quantité de saccharose, bien qu'accrue à 30 jpp, est nettement inférieure à ces composés. Trois autres composés, inconnus, ont été détectés (Inc 1, 6 et 7).

Comparé aux tubercules, le taux plus élevé de glucides dans les hampes provient d'une suraccumulation d'hexoses et de mannitol (**Fig. 3.13B**). Par ailleurs, le profil en glucides, polyols et acides organiques des hampes florales se révèle plus complexe que celui des tubercules, avec la détection de citrate (traces) et de 6 composés inconnus (Inc 1, 2, 4, 5, 6 et 7).

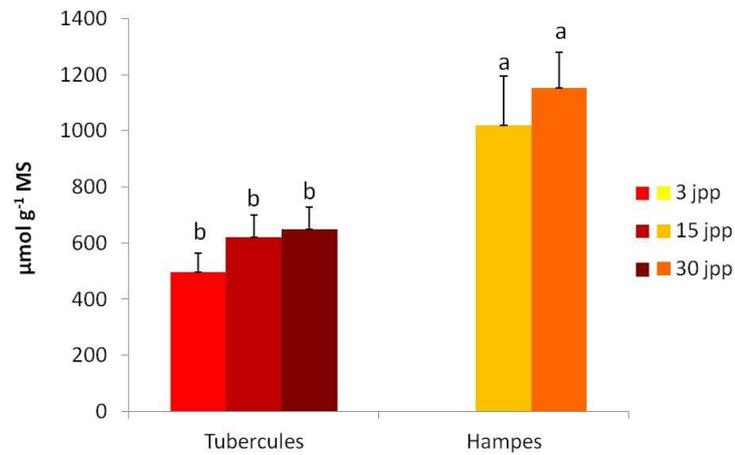


Figure 3.12 : Évolution des teneurs globales en glucides, polyols et acides organiques des tubercules et hampes florales de l'orobanche rameuse parasitant le colza (variété sensible ES Alienor). Cultures en serre alimentées en $K^{15}NO_3$ (2,5 mM, enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de Liquoplant™ FD 134 Hiver 3 ‰. Les teneurs sont exprimées en $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS ($n = 6$, moyennes \pm SE; ANOVA, $P < 0,05$ entre les différents points, test SNK). jpp, jours post-pulse.

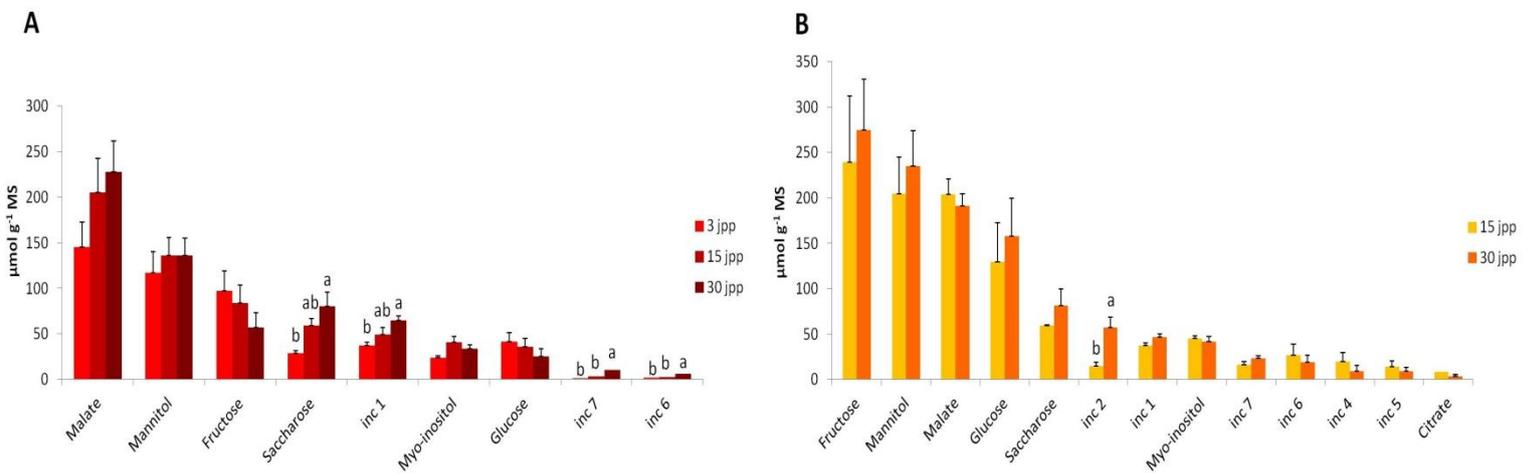


Figure 3.13 : Évolution du profil des principaux glucides, polyols et acides organiques des tubercules (A) et hampes florales (B) de l'orobanche rameuse parasitant le colza (variété ES sensible Alienor). Cultures en serre alimentées en $K^{15}NO_3$ (2,5 mM, enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de Liquoplant™ FD 134 Hiver 3 ‰. Les teneurs sont exprimées en $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS ($n = 6$, moyennes \pm SE; ANOVA, $P < 0,05$ entre les différentes dates d'échantillonnage, test SNK). jpp, jours post-pulse.

- **Glucosinolates**

Comme préalablement précisé, ces analyses sont préliminaires, seuls les tubercules d'orobanche récoltés à 3 jpp ont été analysés. Il est intéressant de noter que les tubercules accumulent à ce stade des GLS dont le profil est sensiblement différent de celui des exsudats phloémiens foliaires du colza hôte, avec une large majorité d'épiprogoitrine (67,8 % des GLS totaux ; **Fig. 3.9B**). Les tubercules contiennent également de la glucoérucine, un GLS non-déecté dans les exsudats phloémiens foliaires du colza hôte. La teneur globale en GLS des tubercules d'orobanche ($20,9 \pm 1,53 \mu\text{mol g}^{-1}$ MS) reste néanmoins bien en deçà de celles des glucides, polyols, acides organiques et AAL.

- **Quantification du ^{15}N**

La teneur en ^{15}N prélevé chez l'hôte et accumulé dans les tubercules d'orobanche est maximale dès 3 jpp et reste stable tout au long du cycle de développement (**Fig. 3.14A**). L'absence de dilution isotopique observée (liée à la prise de biomasse) est potentiellement imputable à l'augmentation du ratio N/C des tubercules au cours du cycle de développement ($3,96 \pm 0,15$ % et $6,22 \pm 0,32$ % à 3 et 30 jpp, respectivement). La répartition du ^{15}N entre la fraction soluble contenant entre autres les AAL et la fraction insoluble contenant entre autres les protéines structurales est constante de 3 à 30 jpp, que ce soit dans les tubercules ou les hampes florales. La fraction insoluble incorpore environ 73 % du ^{15}N accumulé dès 3 jpp (**Fig. 3.14B**). Ces résultats montrent que l'orobanche ne conserve qu'une partie du ^{15}N issu de l'hôte sous forme soluble et que la majeure partie est incorporée rapidement au sein des protéines structurales. Ces résultats semblent toutefois surprenants en comparaison de la capacité de l'orobanche à accumuler des AAL et tendent à remettre en question la nature des composés discriminés au sein des fractions soluble et insoluble.

- **Introduction à la publication**

L'étude des flux globaux de ^{15}N dans l'interaction et les analyses métabolomiques des différents compartiments de l'interaction (exsudats phloémiens et organes) nous amènent dans cette dernière partie à approfondir les singularités du mode de prélèvement et du métabolisme de l'azote inorganique (nitrates, ammonium) et organique (glutamine) chez le parasite.

Suite à l'analyse SMRI de l'incorporation du ^{15}N dans les échantillons bruts d'orobanche et dans les fractions insolubles issues de l'étape d'extraction méthanol/chloroforme/eau (**Fig. 3.14**), nous nous sommes heurtés à l'incapacité technique d'effectuer l'analyse SMRI des fractions solubles (EA-IRMS Integra 2, Sercon, UK). En effet, il s'est avéré impossible de mesurer un rapport isotopique du fait de trop faibles quantités de ^{14}N détectées par rapport à celles du ^{15}N (chargé), l'effet mémoire qui en résulte venant de plus s'ajouter au problème. Parallèlement, nous avons tenté d'identifier les molécules portant potentiellement la majeure partie du ^{15}N des échantillons d'orobanche issus de la culture en serre alimentée en K^{15}NO_3 (2,5 mM, enrichi à 98 %), mais également d'échantillons d'orobanche

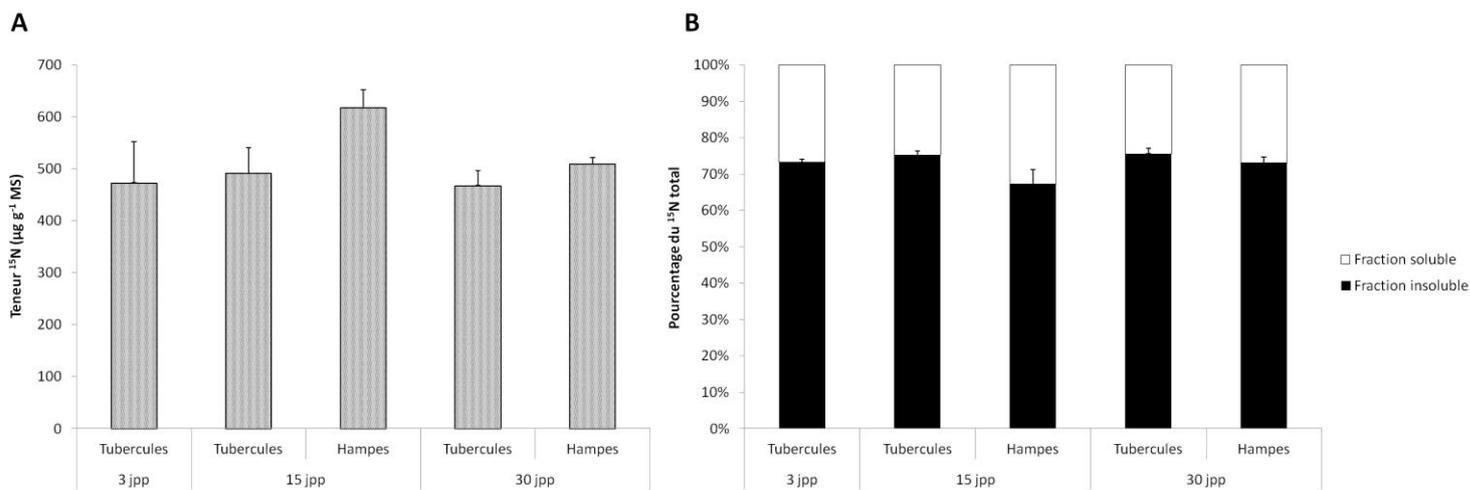


Figure 3.14 : Évolution de la teneur globale en ¹⁵N (A) et de sa répartition entre les fractions soluble et insoluble (B) de l'orobanche rameuse parasitant le colza (variété sensible ES Alienor). Cultures en serre alimentées en K¹⁵NO₃ (2,5 mM, enrichi à 98 %, 200 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de LiquoplantTM FD 134 Hiver 3 ‰. Les teneurs sont exprimées en µg g⁻¹ MS de ¹⁵N (n = 6, moyennes ± SE, ANOVA, P < 0,05 entre les différents points, test SNK non-significatif). jpp, jours post-pulse.

issus des apports racinaires préliminaires de $^{15}\text{N}_2\text{-Gln}$, $^{15}\text{NH}_4^+$ et ^{15}Pro . Dans cette optique, nous avons collaboré avec le laboratoire RMN-RPE (UBO, Brest) et avec la plateforme Métabolisme-Métabolome (IFR87, IBP, Université de Paris-Sud 11, Orsay). L'analyse RMN de ces échantillons fut impossible à réaliser du fait de leur trop faible concentration en ^{15}N . L'analyse par GC-TOF n'a quant à elle pas permis d'identifier de molécules portant la charge de ^{15}N parmi les uréides, allantoinés, polyamines, bétaines et aminoacides (hormis ceux fournis par apport racinaire).

Partant de ce constat, nous avons développé une méthode d'analyse des isotopologues ^{15}N d'aminoacides qui a permis de valider la méthode d'apport des aminoacides marqués, mais surtout de pouvoir suivre leur métabolisation au sein de l'orobanche.

Dans cette optique, notre premier objectif fut de développer une méthode d'apport de composés azotés marqués (^{15}N) aux tubercules d'orobanche par voie phloémienne en réduisant au maximum la distance du transport phloémien et le risque de leur métabolisation chez la plante hôte. Notre second objectif fut de mettre au point une méthodologie d'analyses basée sur l'utilisation du kit AccQ•TagTM (Waters) et d'un système UPLC-PDA-ESI-MS/MS pour l'étude de la transférabilité à l'orobanche des composés azotés d'intérêt et de leur métabolisation dans le parasite. Ces travaux ont fait l'objet d'un article en cours de soumission dans *Analytical Chemistry*.

2.2 Rapid and robust method for investigating nitrogen metabolism of ¹⁵N labeled amino acids using AccQ•Tag UPLC-PDA-ESI-MS. Application to a parasitic plant - plant interaction.

Gaudin Zachary, Cerveau Delphine, Marnet Nathalie, Bouchereau Alain, Delavault Philippe, Simier Philippe, Pouvreau Jean-Bernard

2.2.1 Introduction

Considering the importance of amino acids, a key hub of nitrogen metabolism, as basic structural units for proteins, biosynthetic precursors or source of energy, their accurate analysis is imperative in life sciences. Currently, several modes of amino acid analysis can be used from any biological matrices, such as liquid chromatography, gas chromatography or capillary electrophoresis coupled with fluorescence, ultraviolet-visible, electrochemical or mass spectrometry detection systems (Molnár-Perl, 2003; Kaspar *et al.*, 2008; Callejón *et al.*, 2010). The used technique is selected as a compromise between simplicity, rapidity, sensitivity and robustness. In this context, some studies provide valuable insights into the performance of UPLC-ESI-MS/MS for amino acid quantitation in biological samples using AccQ•Tag derivatization (Cohen, 2000, 2003; Hou *et al.*, 2009a; Armenta *et al.*, 2010; Boughton *et al.*, 2011; Salazar *et al.*, 2012a,b).

Stable isotopes are useful tools for investigating nitrogen nutrition and metabolism in plants. Indeed since ¹⁴N/¹⁵N fractionation occurs during nitrate absorption and assimilation, ¹⁵N natural abundance can be used as metabolic tracer, using gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS) analysis (Evans, 2001; Tcherkez and Hodges, 2007; Molero *et al.*, 2011). Nevertheless awareness of the isotope effects for each enzymatic step and robust modeling (Gauthier *et al.*, 2012a), or metabolic distinctive feature such as C₃/C₄ carbon isotope fractionation (O'Leary, 1981; Farquhar *et al.*, 1989; Pageau *et al.*, 1998) are then required. Another method consists in using ¹⁵N in excess as a tracer easily quantifiable (Rhodes *et al.*, 1989; Limami *et al.*, 2008). Supply of large stable labeled isotopologue amounts allow overlooking isotope effects. Considering that IRMS analysis is not suited to fit with important heavy isotope levels (memory effect), the highly labeled samples are usually analyzed by GC-MS following previous purification and derivatization (BDMS, N-HFBI...)(Patterson *et al.*, 1993; Glevarec *et al.*, 2004; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006b; Mérigout *et al.*, 2008). Nevertheless this method is time-consuming because of the numerous steps of sample preparation and often needs a second analysis for amino acid quantitation usually by liquid chromatography.

We proposed here to evaluate the suitability of AccQ•Tag UPLC-ESI-MS analysis for investigating of nitrogen nutrition and metabolism through quantitation of amino acid isotopologue labeling. Thus we validate here a fast and robust AccQ•Tag UPLC-PDA-ESI-MS method suited to the detection and quantitation of any amino acid isotopologues in a single run, and present secondly an applied illustration concerning amino acid transfer and metabolism in an original plant system corresponding to a host plant - parasitic plant association.

Indeed, this work fits in the study on nitrogen fluxes within the *Brassica napus* - *Phelipanche ramosa* interaction. Strong infestations in winter oilseed rape (*B. napus*) fields by the root parasitic weed *P. ramosa* are reported and consist in serious agronomical problems in the infested regions (Gibot-Leclerc *et al.*, 2006, 2012). Recent data from our laboratory show that the parasitic plant is directly connected to the host root phloem elements, then acting as a strong supernumerary sink for reduced nitrogen (mainly glutamine, Gaudin, unpublished data). In this system, the adventitious roots of the parasitic plant are not functional and the inorganic nitrogen as ^{15}N -nitrate added to the soil is absorbed only by the host roots and massively assimilated in the host leaves. Nitrogen then drove into the host phloem as amino acids (predominantly glutamine during flowering remobilization of nitrogen) toward the parasitic plant. We developed the AccQ•Tag UPLC-PDA-ESI-MS method and used glutamine and ammonium as ^{15}N -tracers for answering two distinct biological questions concerning the interaction functioning: (i) How the parasitic plant metabolizes the host-derived glutamine? (ii) Is the parasitic plant able to use the potentially host-derived ammonium?

2.2.2 Experimental Section

Reagents and Solutions

Amino acid standards, HEPES, 6-Carboxyfluorescein and CaSO_4 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), and S-methyl-L-cysteine sulfoxide from LKT Lab (St Paul, MN, USA). Isotopically labeled amino acid and ammonium chloride standards ^{15}N 98 % [ammonium- ^{15}N , L-asparagine- $^{15}\text{N}_2$, L-glutamine- $^{15}\text{N}_2$, L-arginine- $^{15}\text{N}_4$, L-aspartic acid- ^{15}N , L-glutamic acid- ^{15}N , L-proline- ^{15}N] were made in the Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA) and purchased from Euriso-top (Saint-Aubin, FR). The AccQ•Tag Ultra Eluent A and AccQ•Tag Ultra Derivatization Kit were acquired from Waters Corporation (Milford, MA, USA). Methanol and acetonitrile (both HPLC grade) were purchased from Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, FR). Ultrapure water was produced from a PureLab Classic ELGA system (ELGA LabWater, Antony, FR) coupled with an osmosis water system Millipore (Billerica, MA, USA). Nitrogen gas for mass spectrometric analysis was obtained from a Peak Scientific generator (Billerica, MA, USA) coupled with an air compressor Atlas Copco SF4 (Stockholm, SWE) equipped with a Donaldson Ultrafilter (Minneapolis, MN, USA).

AccQ•Tag Method

Amino acid derivatization with AccQ•Tag reagents was conducted according to the manufacturer's protocol. Briefly, 10 μL of the amino acid containing solution was mixed with 70 μL of AccQ•Tag borate buffer and 20 μL of AccQ•Tag reagent solution. The reaction was allowed to proceed for 10min at 55°C.

Direct Infusion ESI-MS/MS

One $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ solutions of selected amino acid standards were derivatized with AccQ•Tag Ultra as described above, with minor modification according to Salazar and associates (2012)(Salazar *et al.*, 2012b). Considering the nonvolatile nature of the AccQ•Tag borate buffer, an alternative buffer (50 mM ammonium acetate, pH 9.3) was used for the derivatization protocol. The derivatized amino acid solutions were individually infused into the ESI ion source in positive mode (at 150 °C) of the Waters TQD mass spectrometer at a low flow rate ($10 \mu\text{L min}^{-1}$). The desolvation temperature and gas flow rate were 250°C and 300 L h^{-1} respectively. Finally, the cone voltage varied from 25 to 30 V, depending on the amino acid investigated.

Instrumentation

A Waters Acquity UPLC system equipped with a binary solvent manager, an autosampler, a column heater and a PDA detector and coupled with a Waters TQD tandem quadrupole detector via a ZSpray™ probe were used.

Chromatographic separation was achieved using an Acquity UPLC BEH C_{18} column (2.1 mm x 100 mm, 1.7 μm particles) heated at 55°C. Mobile phase A and B were 10% AccQ•Tag Ultra concentrate Eluent A and 100% of pure acetonitrile, respectively. The mobile phase flow was maintained at 0.7 mL min^{-1} during all the following nonlinear separation gradient: initial (99.9 % A); 0.54 min (99.9% A, curve 6); 6.50 min (90.9% A, curve 7); 8.50 min (78.8% A, curve 6); 8.90 min (40.4% A, curve 6); 9.50 min (40.4%, curve 6); 9.60 min (99.9% A, curve 6); 10.10 min (99.9% A, curve 6). One μL of reaction mixture was injected for analysis. Derivatized amino acids were detected at 260 nm using PDA detector (sampling rate of 20 points s^{-1}) and ESI-MS. The mass spectrometer was automatically tuned and calibrated using the Waters IntelliStart software. The ESI source was operated in the positive mode at 150°C, with a desolvation temperature of 450°C, a 900 L h^{-1} desolvation gas flow rate and a capillary voltage set at 4.4 kV. The extractor and radiofrequency voltage were fixed to 3.0 and 0.10 V, respectively. The cone voltage was set by direct infusion for each amino acid. MS methods, with Selected Ion Recording (SIR) mode, were designed with 8 functions corresponding to the 8 selected nitrogen compounds (amino acids + ammonium + internal standard), subdivided by the number of different mass to charge ratios corresponding to the number of possible nitrogen isotopologues in each compounds. Fragmentation in SIR mode with gas collision (Argon) was not required. Even though dwell time was set automatically, it was checked to fit with 15 scans within a peak minimum. Data acquisition and quantitation were performed using both Waters MassLynx and Quanlynx software.

Amino acid identity was confirmed by comparing the retention time and the mass spectra with those of the standards. Quantitation was performed using individual external calibration curves, making reference to the internal standard signal.

Plant material and nitrogen isotope supply

The *Phelipanche ramosa* seeds were collected in 2009 from mature flowering spikes in an infested field of winter oilseed rape (*Brassica napus*) in Saint-Martin de Fraigneau (Vendée, France). Seeds of *B. napus* cultivar Expert (susceptible cv.) were supplied kindly by SARL Adrien Momont & Fils (Mons-en-Pévèle, France).

The host - parasite interaction *B. napus* - *P. ramosa* was grown in a mini-rhizotron system, according to Gauthier and associates (Gauthier *et al.*, 2012b), with minor modifications: 5 host plants per rhizotron, small 12x12 cm Petri-dishes, host root inoculation with *P. ramosa* seeds simultaneously with host plantlets transfer. Host and parasitic plantlets were harvested at the stage of 2-3 leaves and young tubercles carrying small adventitious roots, respectively (Figure 1A).

Two methods of nitrogen isotope supply were developed. The first one consisted in flooding the biological materials (isolated parasitic tubercles and host root portions minus tubercles) during 1 hour in the ^{15}N isotopologue solution (98 % enriched, 87.5 mM). Before the hour of incubation, plant materials were kept during 2 min under vacuum and got over slowly to atmospheric pressure, 3 times in a row, in order to saturate the apoplast compartment of plant tissues with the labeling medium. After harvesting, plant materials were flooding in a CaSO_4 solution (1 mM) and kept 5 min under vacuum to eliminate the nitrogen isotope excess from apoplasts.

The second method consisted in supplying continuously cutting portions of isolated host roots carrying parasitic tubercles with droplets of ^{15}N isotopologue solution, during 30 min, 1 h or 2 h (Figure 1B). The droplet solution was HEPES buffer (50 mM) containing ^{15}N isotopologue (98 % enriched, 87.5 mM) and 6-carboxyfluorescein (1.5 mM). 6-Carboxyfluorescein (6-CF) served as phloem-mobile tracer (Grignon *et al.*, 1989), then facilitating the visualization of the plant materials active in phloem transport and unloading from host roots to parasitic tubercles, using a fluorescence microscope equipped with a GFP2 filter: 480/40 nm excitation; 510 nm emission.

All these samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before analysis.

Amino Acid Extraction from Biological Samples

Freeze-dried plant materials were ground into a fine powder with a bead mill (TissueLyser, Qiagen). Amino acids were extracted through a phase partition procedure using methanol/chloroform/water (2:1:2) as described by Jubault and associates (Jubault *et al.*, 2008). DL-3-aminobutyric acid was used as internal standard (100 μM in methanol). The polar phase was withdrawn for analysis.

Tableau 3.1 : Limits of detection (LOD) and low limits of linearity (LOQ) for AccQ[®]Tag amino acid derivative standards using Selected Ion Recording (SIR).

Compounds	Detection limit (M)	Low limit of linearity (M)
Ammonium	1.99×10^{-6}	6.63×10^{-6}
Ammonium- ¹⁵ N	1.61×10^{-7}	5.38×10^{-7}
L-Asparagine	5.35×10^{-8}	1.78×10^{-7}
L-Asparagine- ¹⁵ N ₂	4.42×10^{-8}	1.47×10^{-7}
L-Glutamine	5.34×10^{-8}	1.78×10^{-7}
L-Glutamine- ¹⁵ N ₂	4.74×10^{-8}	1.58×10^{-7}
L-Arginine	8.98×10^{-8}	2.99×10^{-7}
L-Arginine- ¹⁵ N ₄	5.92×10^{-8}	1.97×10^{-7}
L-Aspartic acid	1.17×10^{-7}	3.89×10^{-7}
L-Aspartic acid- ¹⁵ N	8.73×10^{-8}	2.91×10^{-7}
L-Glutamic acid	5.48×10^{-8}	1.83×10^{-7}
L-Glutamic acid- ¹⁵ N	3.33×10^{-8}	1.11×10^{-7}
L-Proline	2.33×10^{-7}	7.75×10^{-7}
L-Proline- ¹⁵ N	8.18×10^{-8}	2.73×10^{-7}

Equation 1 : The detection limit (LOD) and the low limit of linearity (LOQ) were calculated using the following equations, where SD_{blank} is the standard deviation of the blank and a the slope of the calibration curve.

$$LOD = \frac{3 \times SD_{blank}}{a}$$

$$LOQ = \frac{10 \times SD_{blank}}{a}$$

Statistical analysis

Linear regression of calibration curves are computed with SigmaPlot 10.0 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA). Data were subjected to analysis of variance (ANOVA, $P < 0.05$, SNK and Tukey test or Holm-Sidak method).

2.2.3 Results and Discussion

The aim of this study was to adapt a fast, selective and sensitive AccQ•Tag UPLC-PDA-ESI-MS method using SIR mode, to the inquiry of plant nitrogen metabolism by quantitation of ^{15}N amino acid isotopologues. We wanted to know if this method allows determining the ^{15}N labeling of amino acids by a single run of analysis, and thus following the translocation of labeled amino acids from host plant to parasitic plant and its metabolization into the parasite.

Method development

MS method development included the determination of amino acid isotopologue derivative retention times, the estimation of optimal cone voltage and the adjustment of the number of SIR functions and time windows per functions (**Table III appendix**). Differences in retention times between isotopologues could be observed in SIR mode (for ammonium, aspartic acid and proline). In contrast, different isotopologues corresponded to a unique peak in PDA detection mode.

Limits of detection (LOD) and low limits of linearity (LOQ) of AccQ•Tag amino acid derivatives were obtained from calibration curves using solutions of standard labeled and unlabeled amino acids spiked with constant concentrations of internal standards (10 μM) (**Table 3.1**). Three replicate analyses were performed for each of the 9 selected concentration levels from 10 nM to 20 μM . The high limit of linearity was checked up to 20 μM for each amino acid in SIR mode (data not shown). Because of its broad dynamic range, PDA detection was used to quantitate the highest amounts of amino acids ($^{14}\text{N} + ^{15}\text{N}$) (Cohen, 2000, 2003). The equation used to calculate LOD and LOQ are showed in the **Equation 1**. Compared with available literature, LOD and LOQ values indicated that SIR mode was less sensitive than MRM mode, especially when co-elution occurred (for proline for example), but more sensitive than Full Scan mode. When used for the analysis of complex biological matrices, SIR mode required high levels of manual intervention during data processing and report generation. Nevertheless it was suited to concentrated samples, like those in this study. Ammonium showed a particular behavior with very high LOD and LOQ values due to the presence of ammonium in the AccQ•Tag reagent solution. So, considering the low life duration of the reagent solution, the same kit for sample derivatization and associated calibration curves must be used during one set of analysis, so as to calibration curve intercept had estimated accurately for ammonium.

Equation 2 : The internal standardization method was calculated using the following equation, where RF is a Response Factor, [AA] the amino acid concentration, [IS] the Internal Standard concentration and a the slope of the calibration curve.

$$RF = AA \text{ Area} \times \frac{[IS]}{IS \text{ Area}} = [AA] \times a$$

Table 3.2 : Linear fit data between labeled and unlabeled amino acid ratio (from 5 to 95 % of ¹⁵N amino acid mix) and calibration curves of labeled and unlabeled amino acids, respectively. Corresponding slopes (*a*) do not differ significantly at *P* < 0.05 (Tukey's test). Linear regression of the data is in the form of *y* = *ax* + *y*₀. SE, standard error; R², regression coefficient.

Compounds	¹⁴ N / ¹⁵ N ratio curve			¹⁵ N curve			¹⁴ N curve		
	slope (<i>a</i>)	SE	R ²	slope (<i>a</i>)	SE	R ²	slope (<i>a</i>)	SE	R ²
Ammonium	4.160	0.558	0.745				2.906	0.112	0.981
Ammonium- ¹⁵ N	2.966	0.112	0.974	2.724	0.085	0.994			
L-Asparagine	0.448	0.013	0.985				0.465	0.004	0.999
L-Asparagine- ¹⁵ N ₂	0.532	0.027	0.953	0.526	0.007	0.999			
L-Glutamine	0.498	0.014	0.985				0.485	0.005	0.999
L-Glutamine- ¹⁵ N ₂	0.531	0.029	0.948	0.502	0.008	0.998			
L-Arginine	0.337	0.010	0.985				0.312	0.005	0.997
L-Arginine- ¹⁵ N ₄	0.370	0.021	0.944	0.329	0.003	0.999			
L-Aspartic acid	0.301	0.021	0.992				0.357	0.005	0.997
L-Aspartic acid- ¹⁵ N	0.336	0.009	0.991	0.302	0.011	1.000			
L-Glutamic acid	0.621	0.016	0.991				0.649	0.005	0.999
L-Glutamic acid- ¹⁵ N	0.671	0.021	0.987	0.687	0.016	0.997			
L-Proline	0.487	0.021	0.966				0.494	0.005	0.999
L-Proline- ¹⁵ N	0.636	0.036	0.960	0.690	0.005	1.000			

Table 3.3 : Linear fit data between isotopically labeled amino acid calibration curves within a mix of unlabeled amino acids and/or biological matrix. The biological matrix corresponds to pooled *P. ramosa* tubercle extracts. Corresponding slopes (a) do not differ significantly at $P < 0.05$ (Tukey's test). Linear regression of the data is in the form $y = ax + y_0$. SE, standard error; R^2 , regression coefficient.

Compounds	^{15}N			$^{15}\text{N} + \text{matrix}$			$^{14}\text{N} + ^{15}\text{N}$			$^{14}\text{N} + ^{15}\text{N} + \text{matrix}$		
	slope (a)	SE	R^2	slope (a)	SE	R^2	slope (a)	SE	R^2	slope (a)	SE	R^2
Ammonium- ^{15}N	3.131	0.046	0.999	2.959	0.082	0.995	2.589	0.121	0.987	3.044	0.196	0.945
L-Asparagine- $^{15}\text{N}_2$	0.585	0.023	0.991	0.504	0.017	0.993	0.582	0.020	0.993	0.574	0.016	0.989
L-Glutamine- $^{15}\text{N}_2$	0.522	0.022	0.989	0.518	0.018	0.993	0.561	0.011	0.998	0.580	0.013	0.993
L-Arginine- $^{15}\text{N}_4$	0.348	0.018	0.984	0.342	0.011	0.994	0.358	0.008	0.997	0.400	0.005	0.998
L-Aspartic acid- ^{15}N	0.285	0.009	0.994	0.284	0.006	0.997	0.345	0.006	0.998	0.318	0.020	0.948
L-Glutamic acid- ^{15}N	0.651	0.019	0.995	0.645	0.014	0.997	0.705	0.014	0.998	0.731	0.028	0.979
L-Proline- ^{15}N	0.777	0.028	0.979	0.79	0.01	1.00	0.807	0.024	0.995	0.732	0.026	0.982

Equation 3 : The ^{15}N isotopologue enrichment of each amino acid (AA) was calculated using the following equation, where a is the slope of the corresponding calibration curve. Controls correspond to plants supplied with unlabeled solution.

$$^{15}\text{N AA Labeling} = \frac{\frac{[^{15}\text{AA}_{\text{sample}}]}{[^{14+15}\text{AA}_{\text{sample}}]}}{\frac{[^{15}\text{AA}_{\text{control}}]}{[^{14+15}\text{AA}_{\text{control}}]}} = \frac{\frac{a^1 \times ^{15}\text{AA}_{\text{sample}} \text{Area}_{\text{SIR}}}{a^1 \times ^{15}\text{AA}_{\text{sample}} \text{Area}_{\text{SIR}} + a^2 \times ^{14}\text{AA}_{\text{sample}} \text{Area}_{\text{SIR}}}}{\frac{a^1 \times ^{15}\text{AA}_{\text{control}} \text{Area}_{\text{SIR}}}{a^1 \times ^{15}\text{AA}_{\text{control}} \text{Area}_{\text{SIR}} + a^2 \times ^{14}\text{AA}_{\text{control}} \text{Area}_{\text{SIR}}}}$$

$$^{15}\text{N AA Labeling} = \frac{\frac{[^{15}\text{AA}_{\text{sample}}]}{[^{14+15}\text{AA}_{\text{sample}}]}}{\frac{[^{15}\text{AA}_{\text{control}}]}{[^{14+15}\text{AA}_{\text{control}}]}} = \frac{\frac{a^1 \times ^{15}\text{AA}_{\text{sample}} \text{Area}_{\text{SIR}}}{a^3 \times ^{14+15}\text{AA}_{\text{sample}} \text{Area}_{\text{PDA}}}}{\frac{a^1 \times ^{15}\text{AA}_{\text{control}} \text{Area}_{\text{SIR}}}{a^3 \times ^{14+15}\text{AA}_{\text{control}} \text{Area}_{\text{PDA}}}} = \frac{\frac{^{15}\text{AA}_{\text{sample}} \text{Area}_{\text{SIR}}}{^{14+15}\text{AA}_{\text{sample}} \text{Area}_{\text{PDA}}}}{\frac{^{15}\text{AA}_{\text{control}} \text{Area}_{\text{SIR}}}{^{14+15}\text{AA}_{\text{control}} \text{Area}_{\text{PDA}}}}$$

Table 3.4 : Peak area reproducibility for AccQ®Tag amino acid derivatives from biological samples analyzed by UPLC-ESI-MS. Grey columns correspond to any areas below the low limit of linearity. CV, coefficient of variation for retention time. Nd, not determined.

	Ammonium		L-Asparagine		L-Glutamine		L-Arginine		L-Aspartic acid		L-Glutamic acid		L-Proline		
	¹⁴ N	¹⁵ N	¹⁴ N	¹⁵ N ₂	¹⁴ N	¹⁵ N ₂	¹⁴ N	¹⁵ N ₄	¹⁴ N	¹⁵ N	¹⁴ N	¹⁵ N	¹⁴ N	¹⁵ N	
Day 1	29953	3751	12663	283	9194	265	4894	nd	2603	449	3241	593	nd	nd	
	31263	3894	12360	288	9678	245	5191	nd	2644	440	3467	644	nd	nd	
	32901	3925	13519	302	10190	280	5412	nd	2790	479	3555	653	nd	nd	
Day 2	30252	3831	12164	277	9135	234	4078	nd	2563	418	2982	596	nd	nd	
	31648	3801	11548	255	8732	228	4290	nd	2558	435	3095	531	nd	nd	
	30497	3723	11541	256	8368	210	4194	nd	2384	419	3048	537	nd	nd	
	30177	3581	11336	254	8242	227	3865	nd	2511	424	2939	551	nd	nd	
Average (total)	30955.9	3800.9	12161.6	273.6	9077.0	241.3	4560.6	nd	2579.0	437.7	3189.6	586.4	nd	nd	
CV (%)	Day 1	4.71%	2.41%	4.68%	3.38%	5.14%	6.67%	5.03%	nd	3.67%	4.48%	4.73%	5.14%	nd	nd
	Day 2	2.23%	2.99%	3.08%	4.23%	4.66%	4.59%	4.46%	nd	3.33%	1.84%	2.29%	5.31%	nd	nd
	Total	3.41%	3.06%	6.35%	6.93%	7.71%	9.99%	13.15%	nd	4.82%	4.91%	7.55%	8.43%	nd	nd

Tableau 3.5 : Linear fit data between areas quantitated by PDA detector and SIR mode, from unlabeled, labeled and mix of both standard curves. Linear regression of the data is in the form of $y = ax + y_0$ where y correspond to the PDA detector data and x to the SIR mode data (sum of unlabeled and labeled amino acids) ($n = 62$, $P < 0.0001$ corresponds to constant variance test). SE, standard error; R^2 , regression coefficient.

	slope (a)	SE	P	R ²
Ammonium	155,11	5,69	<0,0001	0,925
L-Asparagine	19,30	0,39	<0,0001	0,976
L-Glutamine	22,74	0,33	<0,0001	0,988
L-Arginine	15,33	0,15	<0,0001	0,994
L-Aspartic acid	13,95	0,34	<0,0001	0,966
L-Glutamic acid	23,57	0,84	<0,0001	0,929
L-Proline	20,70	0,46	<0,0001	0,972

The values reported in this study were obtained by the internal standardization method (**Equation 2**). The external standardization method in which absolute peak areas were correlated to amino acid concentrations, delivered comparable results for calibration (data not shown).

Method validation

The first step was to check the absence of ion suppression effects, especially for the lowest concentrations of labeled amino acids, as a consequence of little amounts of "M + 1" amino acids in "M" standards due to co-elution or isotopic distribution (mainly explained by the ^{13}C abundance). The results in **Table 3.2** consist in comparisons between the calibration curve parameters of unlabeled (^{14}N), labeled (^{15}N) amino acids and increasing $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratios from 5 to 95 % in a mix. They point out statistically good match between the different calibration curves, then showing the absence of ion suppression effects in pure standard solutions. To evaluate the general statement of this finding, we compared the calibration curves of isotopically labeled amino acids in different mixes using unlabeled amino acids and/or a biological matrix consisting in pooled *P. ramosa* tubercle extracts. Results in **Table 3.3** showed no ion suppression effects in pure standard solutions as well in the selected biological matrix.

Reproducibility of amino acid quantitation was evaluated from the biological extracts (**Table 3.4**). Like in other methods (intraday CV < 7 %), it was contingent to amino acid abundance.

The purpose of this study is the determination of amino acid isotopologue enrichment through only single run of analysis. The equation used to calculate isotopologue enrichment of amino acids is showed in the **Equation 3**. For each amino acid, the enrichment corresponded to the ratio of isotopically labeled form on the total amount of this compound (both labeled and unlabeled forms) in the labeled sample divided by the ratio in the control sample (controls correspond to plants supplied with unlabeled solution). For each ratio, ^{15}N amino acid isotopologues were quantitated directly by ESI-MS. The total amount of each amino acid could be evaluated by summing amount of ^{14}N and ^{15}N isotopologues quantitated by ESI-MS or directly by PDA detector, according to the global abundance of the amino acid. This was allowed due to the linearity between PDA and SIR quantitation (**Table 3.5**). ESI-MS was more sensitive than PDA detector (from ≈ 100 -750 nM to 20 μM , depending of the amino acid), but PDA detector has a larger dynamic range (from 0,6-7 μM to 5 mM, depending of the amino acid). Results in **Table 3.6** indicated that the two quantitation methods gave comparable amino acid ^{15}N labeling, for intermediary amino acid abundance (10 μM here). Our method, less sensitive of M+1/M ratio variations, is adapted to quantitate labeling higher than 1 % (^{15}N isotopologue enrichment *versus* the control) compared to the most sensitive classical method (% ^{15}N atom excess).

Application for investigating the plant nitrogen metabolism

Our researches focus on the functioning of the host plant - parasitic plant interaction, *Brassica napus* - *Phelipanche ramosa* (syn. *Orobancha ramosa*). The parasitic plant strictly relies on nutrient uptake from the host phloem elements through a specific structure called

Tableau 3.6 : Comparison between ^{15}N isotopologue enrichments calculated with SIR mode data and PDA detector data for the total amino acid amount (Equation 3), in a labeled sample compared to a control sample. Corresponding data do not differ significantly at $P < 0.05$ ($n=3$, Tukey's test). SE, standard error.

	^{15}N / PDA		^{15}N / SIR	
	^{15}N isotopologue enrichment	SE	^{15}N isotopologue enrichment	SE
Ammonium	154.3%	0.2%	156.0%	1.6%
L-Asparagine	442.4%	7.3%	440.7%	7.3%
L-Glutamine	491.5%	4.5%	469.5%	8.4%
L-Arginine	549.4%	8.5%	564.9%	5.5%
L-Aspartic acid	181.9%	2.2%	187.2%	3.5%
L-Glutamic acid	193.2%	11.6%	202.7%	7.3%
L-Proline	189.5%	3.5%	188.2%	1.5%

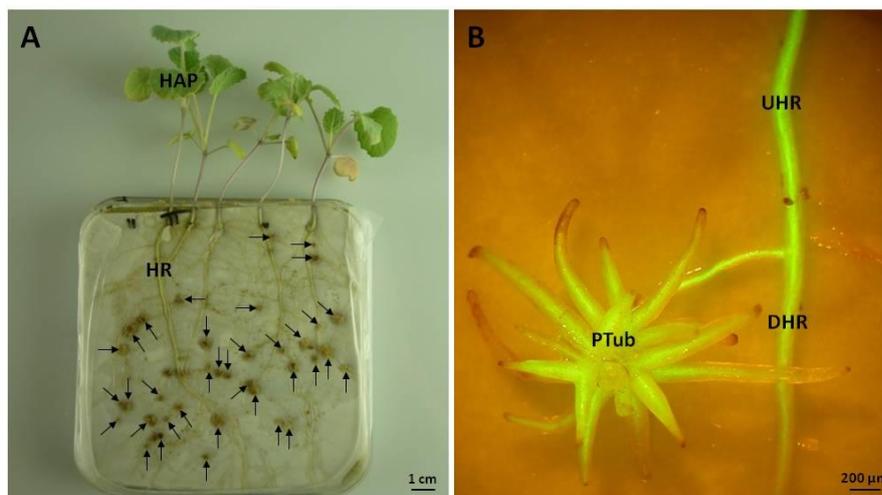


Figure 3.15 : Mini-rhizotron system for the co-culture of the host - parasite interaction *Brassica napus* L. / *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel (A); close-up view of an excised host root portion carrying a parasitic tubercle (fluorescence microscopy). The upstream host root was fed with droplets of 6-carboxyfluorescein (B). HAP, Host Aerial Part; HR, Host Root; UHR, Upstream Host Root; DHR, Downstream Host Root; PTub, Parasitic Tubercle; black arrows correspond to parasitic tubercles.

haustorium. This organ acts as a physical and physiological bridge between both plants and displays direct connections between host and parasite phloem tissues. Tubercle corresponds to the first developed organ of the parasite following attachment to the host roots. It is active mainly in reserve storage in a large parenchyma from the host-derived sugars and amino acids which are unloaded from phloem elements. Considering the significance of nitrogen fertilization for winter oil seed rape cropping (Rathke *et al.*, 2006), the characterization of nitrogen transfer and metabolism in the interaction is of great interest.

We developed two different methods of nitrogen isotope supply. The flooding method corresponded to a simple batch of isolated parasitic tubercles or host roots in the ^{15}N isotopologue solution in order to track the incorporation of isotope nitrogen in biological tissue, probably mainly in the dominant parenchyma. The phloem-mimic method consisted in supplying directly cutting portions of isolated host roots carrying parasitic tubercles with droplets of ^{15}N labeling solution. Being closer to the functioning of the host-parasite interaction, this method takes advantage of a higher physiological significance by mimicking the tubercle dependence to the host root phloem for reduced nitrogen compounds. The transfer of phloem mobile tracer 6-CF from cut host roots toward parasitic tubercles could be easily observed using fluorescence microscopy thus demonstrating the functionality of this simplified biological system.

One of the main free amino acids in both plants is a uncommon sulfur-containing compound, the S-methylcysteine sulphoxide (SMCSO), which is naturally present in most *Allium* and some *Brassicaceae* (Jones, 2004) including oilseed rape. This finding highlights the strong nutritional dependence of the parasitic plant towards the host nitrogen forms. Despite this, host roots and parasitic tubercles display significant differences in the amino acid profile (**Figure 3.15**), reflecting some metabolic characteristics in the parasitic plant. Tubercles accumulated mainly Gln, SMCSO, Asn, Arg, Asp and Glu then representing 85 % of the total amino acid amount while the host roots contained mainly SMCSO, Gln, Glu, Asp, Ser, α -Ala, Thr and GABA which represent 78 % of the total free amino acid amount. Interestingly, tubercles accumulated free amino acids in 6 fold higher level than the host roots, mainly in high N/C ratio amino acids (Gln, Asn, and Arg), then attesting these specific metabolic traits are crucial for tubercle sink towards nitrogen.

A previous study (Rey *et al.*, 1990) in addition to unpublished data from the LBPV laboratory have shown that tubercles are unable to assimilate nitrate because of a very low nitrate reductase activity. Nevertheless they are endowed with a significant cytosolic GS activity (McNally *et al.*, 1983; Hirel *et al.*, 1984) which would be then involved in NH_4 assimilation. When isolated host roots and parasitic tubercles were fed with $\text{NH}_4\text{-}^{15}\text{N}$ through separate batch incubation, our findings attested of the incorporation of $\text{NH}_4\text{-}^{15}\text{N}$ in both plants through similar assimilation pathways (**Figure 3.16**), resulting in a significant ^{15}N incorporation into $\text{Gln-}^{15}\text{N}_2$ through the assumed GS-GOGAT cycle activity. ^{15}N enrichment reported in **Figure 3.17** did not reflect the respective intensity of NH_4 assimilation in both plants. GS-GOGAT cycle activity can be estimated from the amount of $\text{Gln-}^{15}\text{N}_2$ produced during the batch incubation ($\text{nmol Gln-}^{15}\text{N}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MS}$), i.e. 46.3 ± 6.1 in tubercles and 19.2 ± 3.7 in host roots. Consequently, parasitic tubercles displayed a good capacity for NH_4 assimilation when NH_4 is supplied by batch incubation.

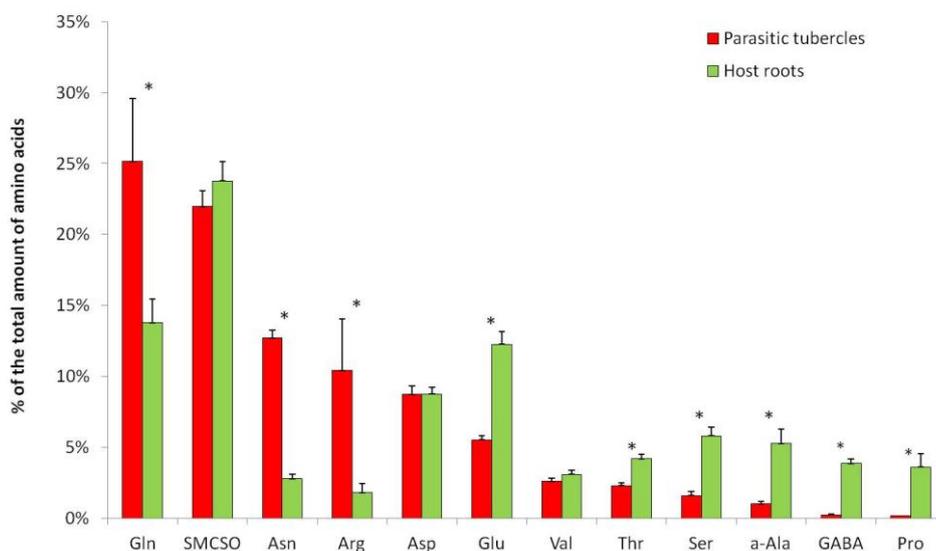


Figure 3.16 : Amino acid profiles of parasitic tubercles (*P. ramosa*) and host roots (*B. napus*) expressed as percentage of the total amino acid amount (371.8 and 66.3 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW, respectively). Data are means \pm SE (n=10, * $P < 0.05$ parasitic tubercles versus host root, *t*-test on arcsin normalized data).

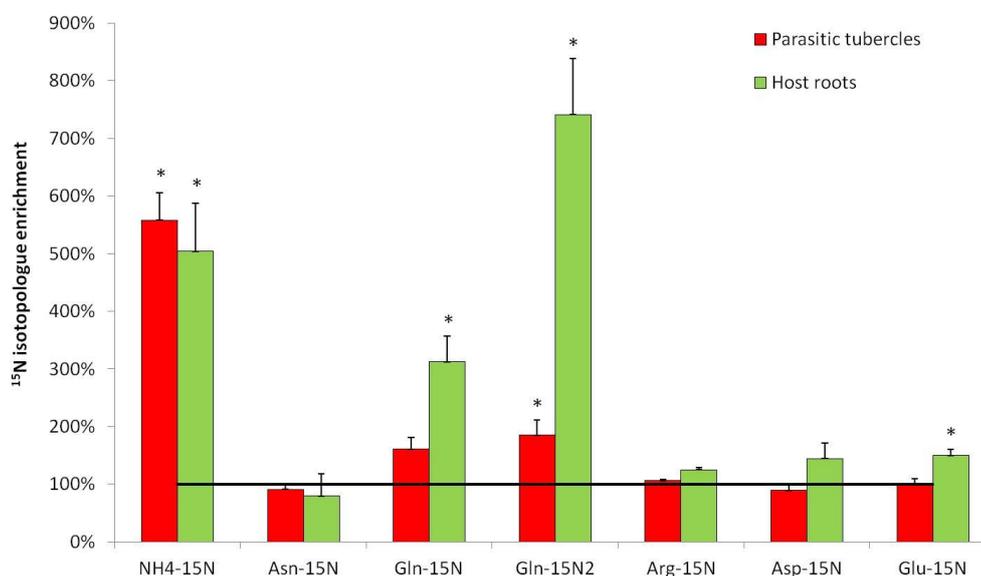


Figure 3.17 : ^{15}N isotopologue enrichment of amino acids in parasitic tubercles (*P. ramosa*) and host roots (*B. napus*). The isolated organs were labeled separately through batch incubation in $\text{NH}_4^+ \text{-}^{15}\text{N}$ solution (98 % enriched, 87.5 mM) for 1 hour. Black line corresponds to natural ^{15}N isotopologue enrichment of amino acids. Data are means \pm SE (n=5, * $P < 0.05$ versus non labeled control, ANOVA, Holm-Sidak method).

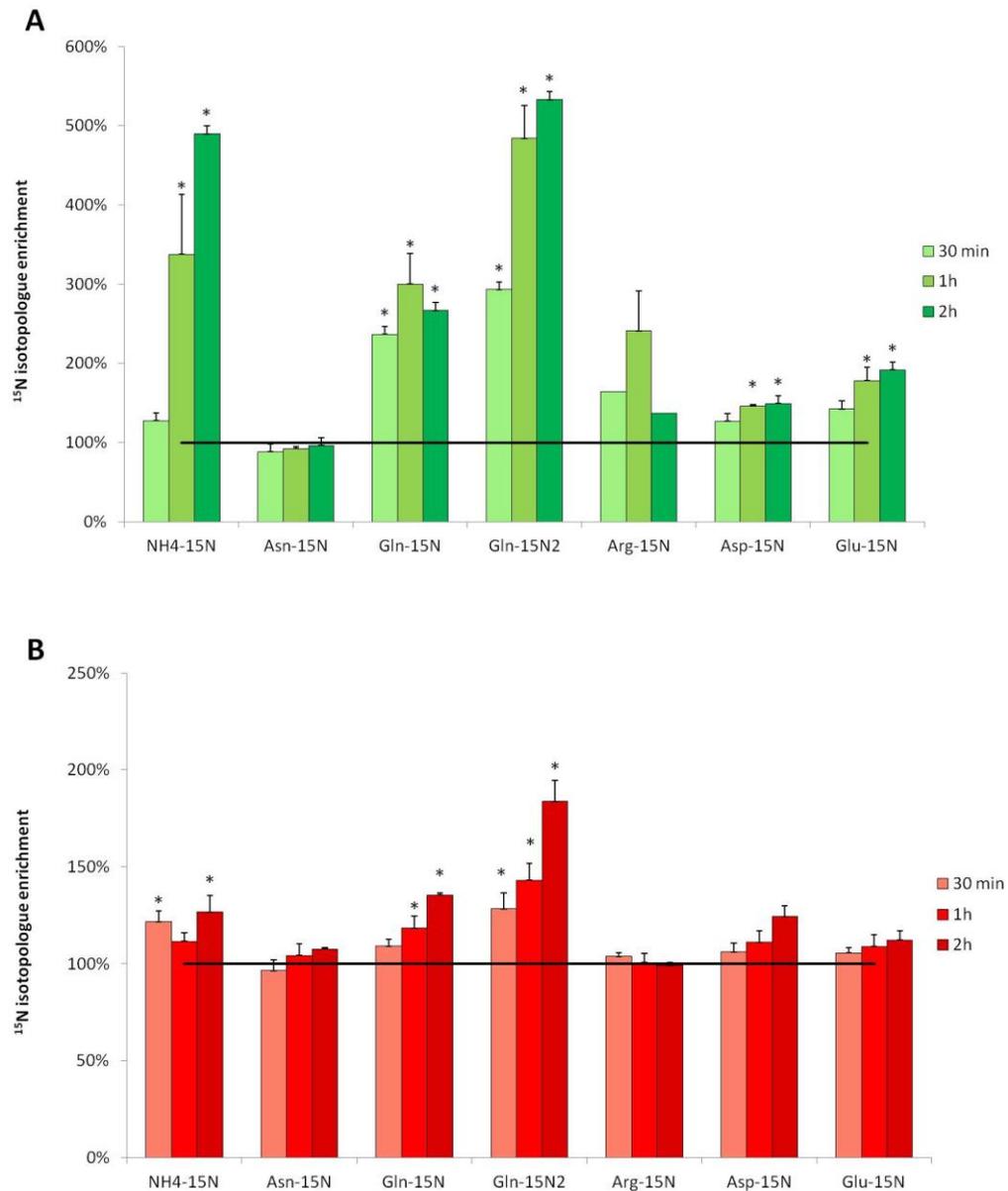


Figure 3.18 : Gradual ¹⁵N isotopologue enrichment of amino acids in the upstream host roots (*B. napus*, A) and parasitic tubercles (*P. ramosa*, B). The upstream host roots were fed with droplets of NH₄⁺-¹⁵N (98 % enriched, 87.5 mM) during 30 min, 1 h or 2 h. Black lines correspond to natural ¹⁵N isotopologue enrichment of amino acids. Data are means ± SE (n = 5, * P < 0.05 versus non labeled control, ANOVA, Holm-Sidak method).

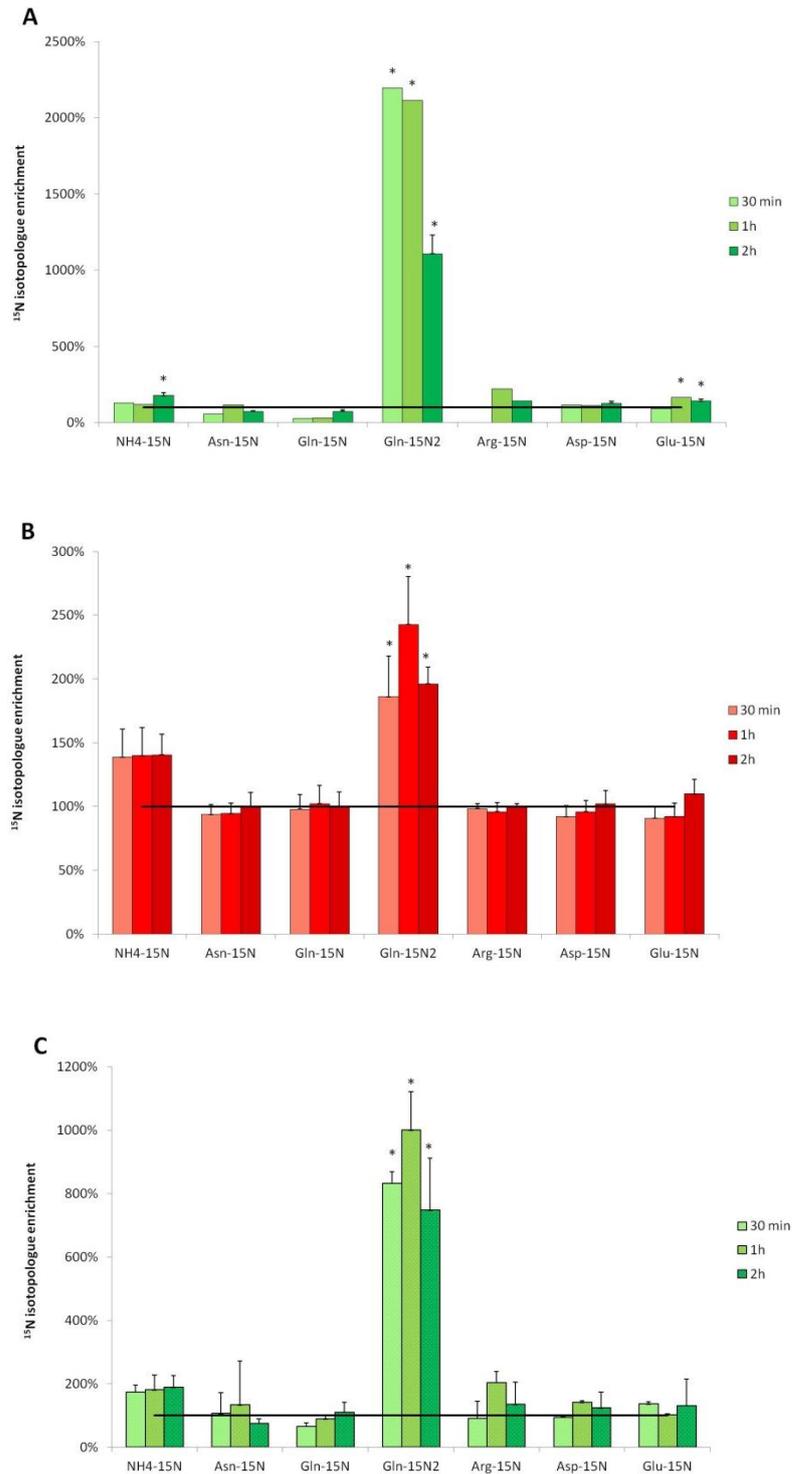


Figure 3.19 : Gradual ^{15}N isotopologue enrichment of amino acids in the upstream host roots (*B. napus*, A), parasitic tubercles (*P. ramosa*, B) and the downstream host roots (C). The upstream host roots were fed with droplets of $\text{Gln-}^{15}\text{N}_2$ (98 % enriched, 87.5 mM) during 30 min, 1 h or 2 h. Black lines correspond to natural ^{15}N isotopologue enrichment of amino acids. Data are means \pm SE (n = 5, * $P < 0.05$ versus non labeled control, ANOVA, Holm-Sidak method).

Considering the physiology of the host-parasite interaction, NH_4 assimilation by the parasitic plant depends on the phloem mobility of this compound in the host plant. In a second set of experiment, $\text{NH}_4\text{-}^{15}\text{N}$ was also supplied to cutting portions of host roots (upstream part) carrying tubercles (**Figure 3.18**). ^{15}N labeling into $\text{Gln-}^{15}\text{N}$ and $\text{Gln-}^{15}\text{N}_2$ could be observed in the upstream roots early from 30 min of $\text{NH}_4\text{-}^{15}\text{N}$ supply whereas $\text{NH}_4\text{-}^{15}\text{N}$ and in lower extent $\text{Glu-}^{15}\text{N}$ and $\text{Asp-}^{15}\text{N}$ were labeled after 1 h. Our findings showed that, $\text{NH}_4\text{-}^{15}\text{N}$ accumulated gradually over labeling experiments in the upstream host roots, concomitantly to a fast incorporation of ^{15}N into $\text{Gln-}^{15}\text{N}$, $\text{Gln-}^{15}\text{N}_2$ and $\text{Glu-}^{15}\text{N}$, then assuming an active GS-GOGAT cycle in these tissues. Asp was low labeled, thus showing to the transfer of ^{15}N -amine from $\text{Glu-}^{15}\text{N}$ by a low aspartate aminotransferase activity. Interestingly, tubercles localized downstream of the fed host root portions showed weak $\text{NH}_4\text{-}^{15}\text{N}$ accumulation, and high and gradual accumulation of $\text{Gln-}^{15}\text{N}$ and $\text{Gln-}^{15}\text{N}_2$. In accordance with the rapid NH_4 metabolism in the downstream roots, these results suggested that NH_4 was not driven in host roots towards tubercles in these experiments, but was primarily assimilated into Gln in the downstream roots and then transferred to tubercles through the root phloem elements.

In a third set of experiment, Gln assimilation in the host - parasite system could be detailed by feeding the cutting upstream host roots with Gln isotopically labeled on both amide and amine functions. A strong enrichment in $\text{Gln-}^{15}\text{N}_2$ was quantitated early from 30 min in both upstream and downstream host roots on each side of the tubercles (about 16 and 8 fold more enriched compared to control roots, respectively) (**Figure 3.19**). This was concomitant to the very low metabolization of Gln in upstream host roots underlined by the weak ^{15}N enrichment in NH_4 and Glu. These findings highlight the role of Gln as a major long distance nitrogen carrier in *B. napus*. This model is strengthened by the literature that demonstrated the importance of Gln as a long-distance nitrogen carrier in plants (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006b), notably through the coexpression of GS and GOGAT genes in phloem companion-cells, consistent with the view that synthesis of the major long-distance nitrogen carriers are partly located in the phloem for translocation through the vascular bundle (Potel *et al.*, 2009).

In our experiment, Gln was highly transferred into the parasitic tubercles, as evidenced by a 2 fold ^{15}N enrichment of $\text{Gln-}^{15}\text{N}_2$ despite the high initial size of the Gln pool in this organ. Young parasitic tubercles incorporated 2 fold higher $\text{Gln-}^{15}\text{N}_2$ amount than the downstream roots (65.8 ± 11.5 vs 24.5 ± 5.8 nmol $\text{Gln-}^{15}\text{N}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ MS). Surprisingly, no other free amino acids were labeled in tubercles after 2 h of labeling. This finding shows that the tubercle is a strong sink for host-derived Gln which represents a major non-structural form of nitrogen sequestration. Nevertheless Gln utilization in the parasite for peptides, proteins and nitrogen-containing secondary metabolites biosynthesis needs clarification.

2.2.4 Conclusions

AccQ•Tag UPLC-PDA-ESI-MS method has been proved to be an easy, fast and sensitive method for amino acid analysis. Our study proves the adaptability of this robust analytical procedure to the quantitation of amino acid isotopologue enrichment. The duality of the detection process allows sensitive quantitation of isotopically labeled amino acids by ESI-MS

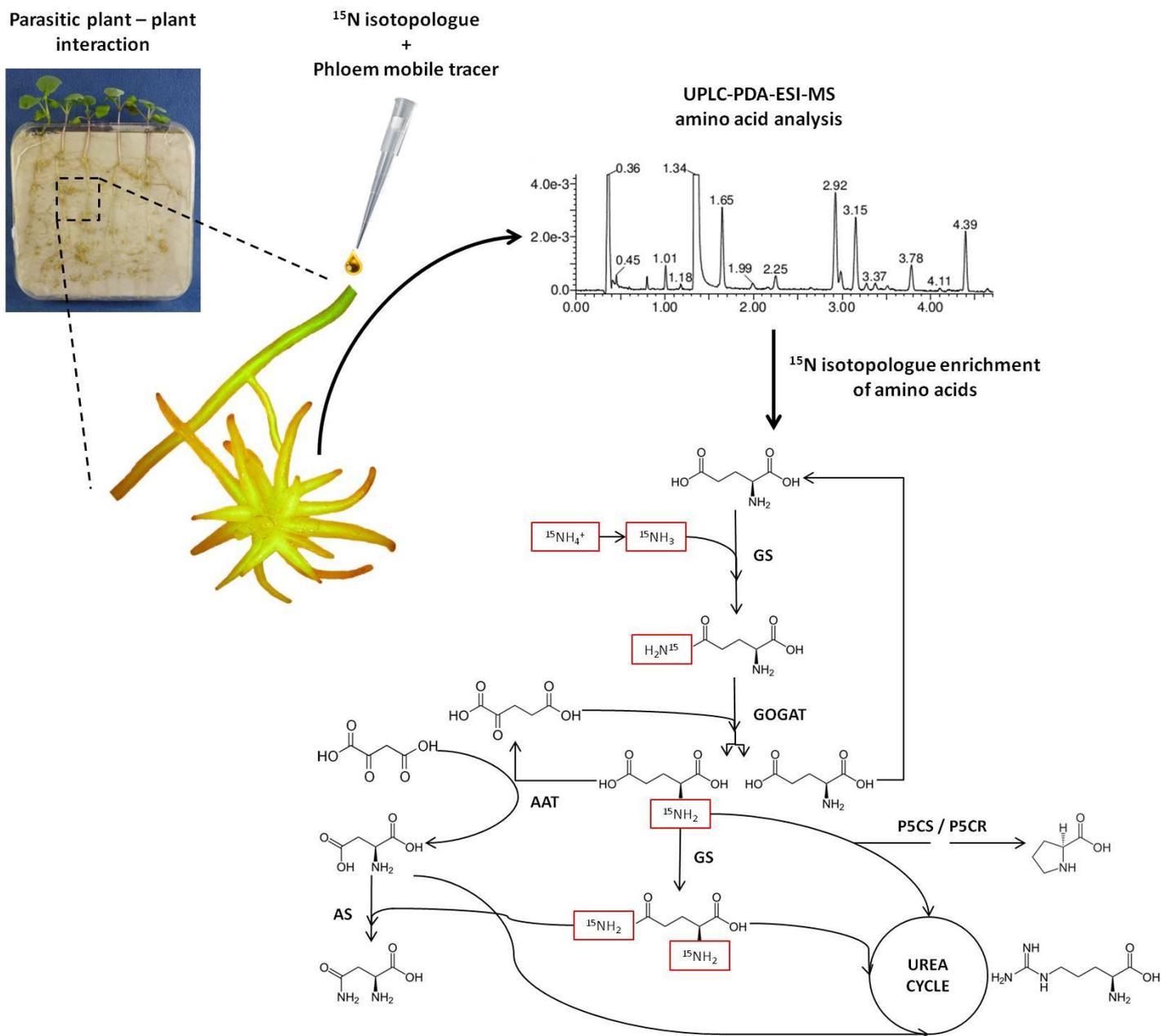


Figure 3.20 : "Abstract Graphic"; Ammonium assimilation pathway into amides and amino acids deduced from ^{15}N labeling experiments and UPLC-PDA-ESI-MS analysis in parasitic tubercles (*Phelipanche ramosa*) attached to nutritive host root (*Brassica napus*). GS (Glutamine Synthetase), GOGAT (Glutamine OxoGlutarate AminoTransferase), AAT (Aspartate AminoTransferase), AS (Asparagine Synthetase), P5CS / P5CR (Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase / Reductase).

simultaneously with large dynamic range of amino acid quantitation by PDA detector. Thus, the isotopologue enrichment of amino acids within relatively concentrated samples can be obtained by a single run of analysis. While additional studies will be useful for a better understanding of nitrogen metabolism in the parasitic plant of interest, we used successfully the proposed method to get new data on nitrogen transfer and metabolism in the studied host plant - parasitic plant system. Consequently, this work will provides a rapid and robust method of liquid chromatography analysis for investigating plant nitrogen nutrition and metabolism in plants.

Author information

Authors' contributions

ZG, JBP, PS and PD designed the development of technical and biological experiments. ZG and DC carried out plant material and ¹⁵N labeling. ZG, DC and NM performed technical development and analysis. PS and JBP supervised ZG thesis and drafted the manuscript. AB supervised the P₂M₂ platform and drafted the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

This work was supported by funding awarded to the Ph-D students ZG from the French Ministry of Education and Research.

Authors

Zachary Gaudin; EA 1157, Laboratoire de Biologie et de Pathologie Végétales (LBPV), Université de Nantes, SFR 4207 QUASAV, 44322 Nantes, France; zachary.gaudin@univ-nantes.fr

Delphine Cerveau; UMR 7265 (CNRS/CEA/Université d'Aix-Marseille), Laboratoire d'écophysiologie moléculaire des plantes (LEMP), Centre d'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives de Cadarache, 13108 Saint Paul lès Durance, France; delphine.cerveau@cea.fr

Nathalie Marnet; Plateau de Profilage Métabolique et Métabolomique (P₂M₂) Centre de recherche Angers-Nantes BIA, INRA de Rennes, 35653 Le Rheu, France; nathalie.marnet@rennes.inra.fr

Alain Bouchereau; UMR 1349 Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes (IGEPP), INRA – Agrocampus Ouest – Université de Rennes 1, INRA de Rennes, 35653 Le Rheu, France; alain.bouchereau@univ-rennes1.fr

Philippe Delavault; EA 1157, Laboratoire de Biologie et de Pathologie Végétales (LBPV), Université de Nantes, SFR 4207 QUASAV, 44322 Nantes, France; philippe.delavault@univ-nantes.fr

Philippe Simier; EA 1157, Laboratoire de Biologie et de Pathologie Végétales (LBPV), Université de Nantes, SFR 4207 QUASAV, 44322 Nantes, France; philippe.simier@univ-nantes.fr

Jean-Bernard Pouvreau; EA 1157, Laboratoire de Biologie et de Pathologie Végétales (LBPV), Université de Nantes, SFR 4207 QUASAV, 44322 Nantes, France; jean-bernard.pouvreau@univ-nantes.fr

Corresponding author: Jean-Bernard Pouvreau

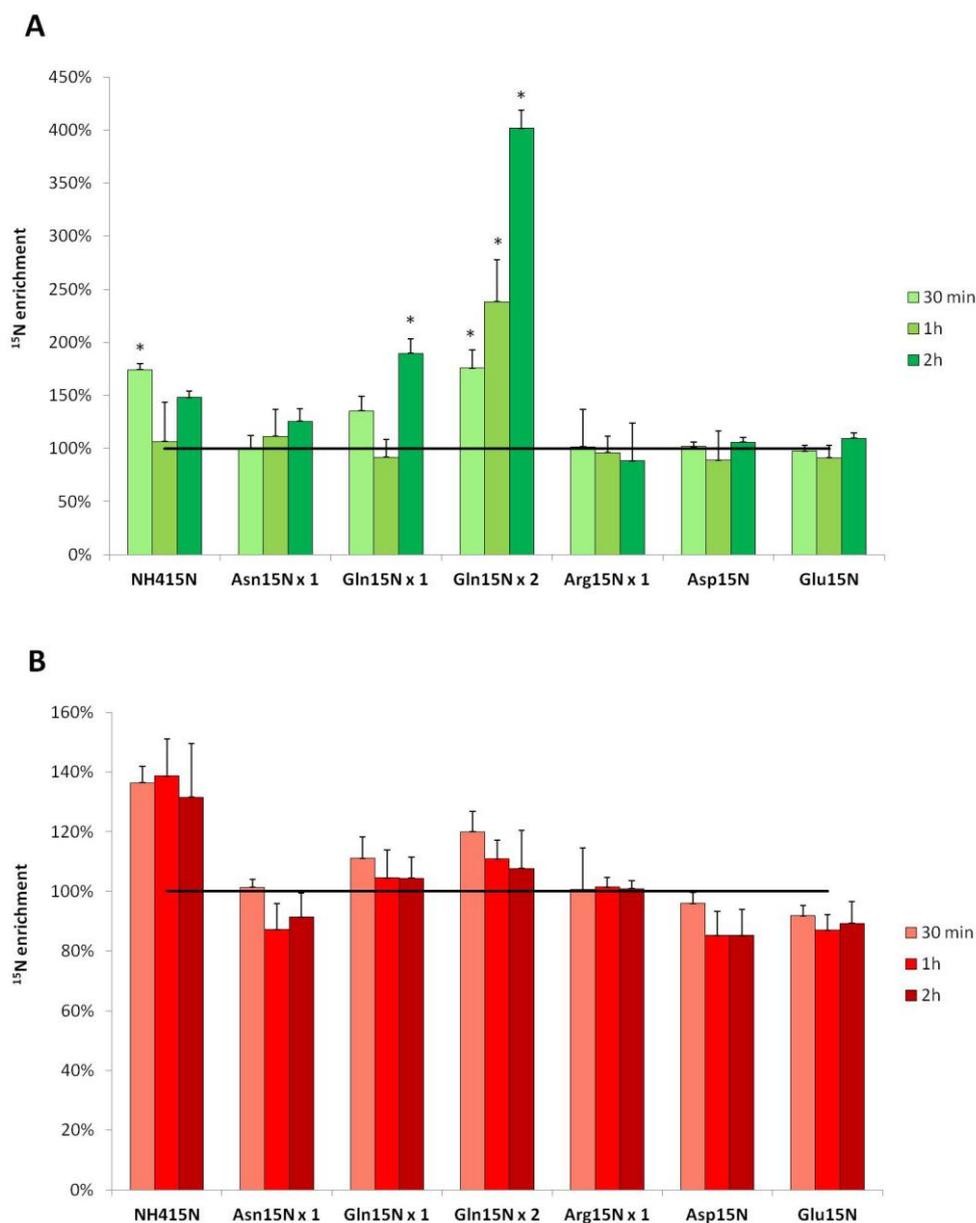


Figure 3.21 : Évolution de l'enrichissement en ^{15}N isotopologue des aminoacides libres de racines de colza (A) et de tubercules d'orobanche (B). Les organes isolés ont été incubés en batch séparés de $^{15}\text{NO}_3^-$ (87,5 mM, enrichi à 98 %) pendant 30 min, 1 h et 2 h. La ligne noire correspond à l'enrichissement naturel en ^{15}N isotopologue (moyenne \pm SE, n = 3, ANOVA, * $P < 0,05$ versus contrôles non-marqués, méthode Holm-Sidak).

2.3 Résultats complémentaires

Bien qu'il s'agisse de résultats préliminaires nécessitant d'être répétés du fait de la variabilité obtenue entre les différents temps d'échantillonnage et du trop faible nombre de répétitions biologiques, nous pouvons observer un net différentiel entre la métabolisation du $^{15}\text{NO}_3$ observée dans la racine de colza et l'absence de marquage significatif dans les tubercules (**Fig. 3.21**). En effet, suite à un marquage par incubation de portions de racines de colza dans une solution de $^{15}\text{NO}_3$, un enrichissement significatif en $^{15}\text{NH}_4$ et de la $\text{Gln-}^{15}\text{N}_2$ est observé dès 30 min. Ce marquage s'accompagne à 2 h d'un enrichissement en $\text{Gln-}^{15}\text{N}$. À l'inverse, aucun enrichissement significatif n'est observé dans les tubercules d'orobanche incubés de la même façon.

3 Discussion

- **Rôle particulier de certains aminoacides chez le colza en conditions de non-infestation**

Le SMCSO ou methiine (pour S-méthylcystéine sulfoxide) occupe une place centrale dans le métabolisme azoté et soufré du colza, qui en accumule en effet de grandes quantités dans tous ses organes, tout au long de son cycle ontogénétique. Ce composé représente 11,8 à 31,8 % des AAL totaux, tous organes confondus (**Fig. 3.2**). Cet aminoacide soufré, spécifique des *Allium* où il joue le rôle de précurseur de composés volatiles soufrés lacrymogènes caractéristiques (Lancaster and Shaw, 1991 ; Thomas and Parkin, 1994 ; Randle *et al.*, 1995), est également abondant chez quelques représentants des *Brassicaceae* (Griffiths *et al.*, 1991 ; Marks *et al.*, 1992 ; Stoewsand, 1995 ; Kubec *et al.*, 2001 ; Horie and Yamashita, 2006). Les études réalisées sur le colza sont majoritairement axées sur l'impact de ce métabolite sur la nutrition des ruminants, le diméthyl disulfide issu de la fermentation du SMCSO provoquant de l'anémie (Barry, 2013), et donc sur les teneurs relatives des organes fourragés (feuilles et tige ; Fales *et al.*, 1987 ; Griffiths and Smith, 1989 ; Griffiths *et al.*, 1994). Cet aminoacide est issu de la (thio)alk(en)ylation de la cystéine dans la voie de biosynthèse du glutathion, d'où le terme de γ -glutamyl-peptide, ou d'un précurseur du type O-acetyl-serine ou O-acetyl-cystéine (Jones, 2004). La dégradation de ce composé est assurée par des aminotransférases à activité cystéine-sulfoxide lyases (C-S lyases), incluant l'alliinase (EC. 4.4.1.4), la cystathionine lyase (EC. 4.4.1.1), la cystine lyase (EC 4.4.1.8), la L-cystéine desulphydrase, l'O-acetylserine thiol lyase (EC 2.5.1.47)..., dont certains seraient probablement impliqués dans d'autres voies de biosynthèse comme celles des glucosinolates ou des glycosides cyanogéniques (Kiddle *et al.*, 1999; Ramírez and Whitaker, 1999; Jones, 2004). Les produits de dégradation sont multiples mais généralement constitués de thiols plus ou moins complexes et volatils (H₂S, diméthyl trisulfide, thiosulfates...), de pyruvate ou d'autres acides cétoniques et d'ammoniaque. L'omniprésence du SMCSO au sein des différents organes du colza, son accumulation dans les feuilles sénescents (30 jpp, **Fig. 3.2**), sa présence dans les exsudats phloémiens foliaires (*Fig. 3.5*), et sa composition particulière (C, N, S) en font un candidat particulièrement adapté à la remobilisation de l'azote et du soufre lors du développement végétatif et du remplissage des graines, comme ça l'est pour la S-méthylmethionine chez le pois (Tan *et al.*, 2010). De ce point de vue, notre étude est relativement novatrice et révèle l'importance potentiel de cet aminoacide au croisement des métabolismes soufrés et azotés du colza.

La Pro est un marqueur d'azote dose-dépendant (Sánchez *et al.*, 2001). Son accumulation dans l'hypocotyle et surtout dans la tige (**Fig. 3.2B et C**) au moment de la remobilisation de l'azote nécessaire à la formation des siliques (15 jpp ; **Fig. 3.2E**) suggère l'importance de cet aminoacide dans le recyclage de l'azote chez le colza. Nos résultats concordent avec le rôle présumé de cet aminoacide comme forme de stockage d'une quantité importante d'azote dans la tige, organe de stockage transitoire permettant d'accumuler l'azote issu des feuilles sources tombées avant la phase de remplissage des graines (Gombert *et al.*, 2010). La Pro est par ailleurs un AAL majeur des siliques à 15 jpp (**Fig. 3.2E**). Par contre, la Pro est faiblement représentée dans les exsudats phloémiens des feuilles adultes basales (**Fig. 3.5**) et ne correspond donc pas à une forme azotée majeure exportée de ces feuilles.

La Gln est également un des aminoacides majoritaires des différents organes du colza (**Fig. 3.2**), mais son rôle prédominant apparaît comme étant celui de transporteur d'azote longue distance préférentiel. En effet, une accumulation accrue de Gln est observée dans les feuilles sénescentes (30 jpp ; **Fig 3.2D**), les racines, la tige et les siliques et dans la tige, au moment de la remobilisation nécessaire à la formation des siliques (15 jpp ; **Fig. 3.2**), mais on observe surtout une très forte accumulation de Gln dans les exsudats phloémiens des feuilles basales sur cette période, correspondant à 24 fois la quantité mesurée en sortie de vernalisation (3 jpp). À 15 jpp, la Gln représente alors 37,6 % de l'azote contenu dans les AAL des exsudats phloémiens foliaires. Ces résultats concordent avec le rôle présumé de la Gln, mais aussi du Glu et de l'Asn comme formes préférentiellement véhiculées via le phloème chez le tabac et *A. thaliana* (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006 ; Potel *et al.*, 2009), mais également chez le colza (Lohaus and Moellers, 2000 ; Tilsner *et al.*, 2005), bien qu'aucune étude n'avait pour l'instant mis en avant le très fort enrichissement en Gln observé dans notre étude lors de la phase de formation des siliques.

- **Impact de l'infestation par l'orobanche rameuse sur les métabolites accumulés et transférés chez le colza**

Bien qu'une forte perturbation des relations sources-puits soit observée en post-vernalisation chez le colza infesté (**Fig. 2.9**), l'infestation n'induit aucun changement drastique du pool global et du profil des AAL des différents organes du colza (**Fig. 3.3**). Une légère accumulation de Gln (significative) et de nombreux AAL minoritaires est observée à 30 jpp dans les racines, l'hypocotyle et la tige, suggérant une limitation de la remobilisation de l'azote à partir de ces organes en fin de culture. Ainsi, l'infestation n'est pas perçue par le colza comme un stress biotique ou abiotique, qui se traduirait, en réponse à un stress hydrique par exemple, par une forte accumulation de Pro dans les feuilles (Szabados and Savouré, 2010 ; Albert *et al.*, 2012). Une réponse semblable a été décrite chez la carotte parasitée par *P. aegyptiaca*, où seules de légères différences quantitatives (augmentation dans les feuilles, diminution dans les racines) ont été observées pour les AAL majoritaires en réponse à l'infestation (Nandula *et al.*, 2000).

Par contre, l'infestation impacte significativement l'exportation phloémienne des glucides, notamment du saccharose (**Fig. 3.7 et 3.8**), et surtout des AAL, principalement de la Gln (**Fig. 3.4 et 3.6**), à partir des feuilles adultes basales du colza. En effet, une légère augmentation de la quantité de glucides et d'AAL majeurs est notable dans les exsudats phloémiens foliaires en sortie de vernalisation (3 jpp). Cependant, l'impact principal est observé à 15 jpp, avec une chute très importante du contenu des exsudats en AAL, notamment en Gln. L'infestation induit donc un changement drastique au niveau de la remobilisation de l'azote foliaire durant la période de formation de siliques (15 jpp). Ce changement peut-être imputable à un décalage ou un rétrécissement de la fenêtre temporelle de remobilisation nécessaire à la formation des siliques, voire à une inhibition forte de signaux nécessaires au déclenchement d'une remobilisation synchronisée. L'accumulation, certes de faible amplitude, d'AAL à 30 jpp dans les racines, l'hypocotyle et la tige du colza infesté soutient cette hypothèse (**Fig. 3.3**). En conséquence, la quantité totale d'azote parvenue aux siliques semble être insuffisante en conditions

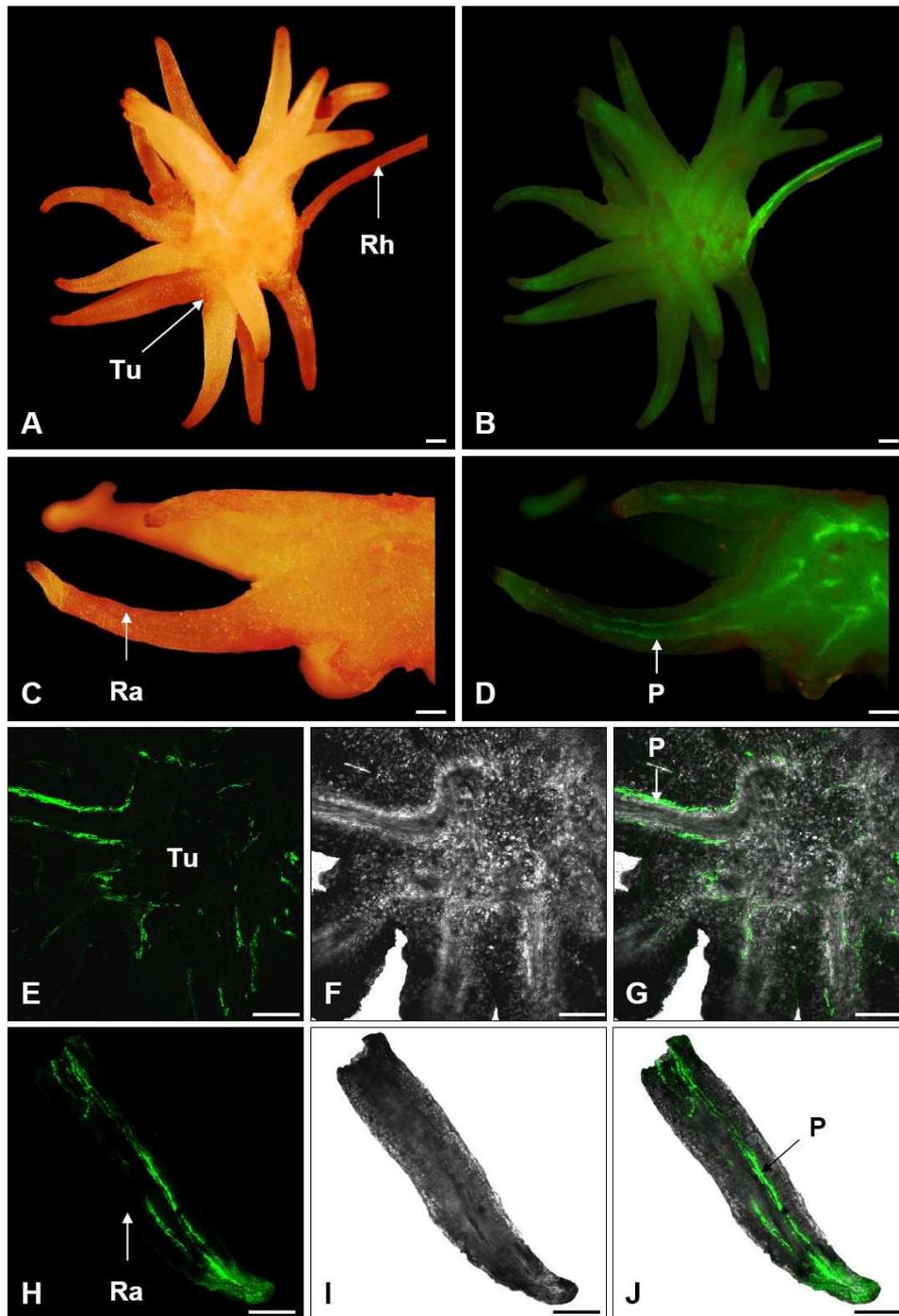


Figure 3.22 : Traçage du flux de sève phloémienne entre *B. napus* et de jeunes tubercules de *P. ramosa*, 2 heures après application de 6-CF sur l'hôte (Péron, 2010)

A-D : Observations macroscopiques. A et B tubercules entier. C et D coupe transversale de tubercule. A et C lumière blanche. B et D fluorescence. E-J Observations en microscopie confocale. E-G Coupe transversale de tubercule. H-J Coupe transversale de racine adventive. E et H Imagerie en mode MCBL. F et I Imagerie en mode transmission. G et J Superposition des images MCBL et transmission. Tu, tubercule ; Rh, racine hôte ; Ra, racine adventive ; P, phloème. La 6-CF, cantonnée au phloème, est responsable de l'émission de fluorescence verte observée en macroscopie et au MCBL. Barre d'échelle = 500 μ m.

d'infestation, pour permettre un remplissage optimal des graines, d'où un taux d'avortement des graines deux fois supérieur à celui des colzas non-infestés.

- **Détournement et métabolisation des métabolites phloémiens du colza par l'orobanche rameuse**

Dans l'interaction colza (ES Alienor) - orobanche, les feuilles sont les organes sources uniques du parasite (**Fig. 2.9**). Par l'emploi d'un traceur phloémien (6-carboxyfluorescéine) appliqué aux feuilles du colza hôte, T. Péron (2010) a démontré l'existence d'un continuum symplasmique reliant les tissus phloémiens foliaires du colza aux tissus phloémiens du tubercule et de la hampe florale de l'orobanche (**Fig. 14**), suggérant l'existence de plasmodesmes interspécifiques à l'interface hôte-parasite, comme démontré dans l'interaction *O. crenata/Vicia narbonensis* (Dörr and Kollmann, 1995), et d'un réseau symplasmique phloémien au sein du parasite reliant les tissus phloémiens de l'haustorium, du tubercule et de la hampe florale (**Fig. 3.22**). Par contre, cette étude montre également qu'au sein du parasite, les tissus phloémiens sont isolés apoplastiquement des autres tissus, ce qui oblige une décharge de nature apoplastique des assimilats dans les tissus puits du tubercule et de la hampe florale par le biais de transporteurs plus ou moins spécifiques. Globalement, il ressort de nos différentes analyses métabolomiques une similitude relativement forte entre les profils des exsudats phloémiens foliaires du colza hôte et ceux du tubercule et de la hampe florale de l'orobanche, notamment concernant les AAL (**Fig. 3.2, 3.5, 3.11 et 3.13**). Ce constat, également réalisé pour les interactions carotte - *P. aegyptiaca* et fève - *O. foetida* (Nandula *et al.*, 2000 ; Abbes *et al.*, 2009), traduit l'absence d'une importante sélectivité lors de la décharge phloémienne au sein de l'orobanche et suggère ainsi l'activité d'une large panoplie de transporteurs impliqués dans ce processus. Ce mode de décharge apparaît comme un élément clé du développement de l'orobanche en post-fixation, en s'opposant à l'effacement progressif du gradient de concentrations en assimilats entre les tissus phloémiens et les tissus puits.

L'analyse comparative des profils métabolomiques des exsudats phloémiens foliaires du colza et des tubercules et hampes florales de l'orobanche révèle d'autres éléments majeurs de la force de puits du parasite :

(i) Le SMCSO, moyennement abondant dans les exsudats phloémiens (**Fig. 3.5**), s'accumule fortement dans les organes du parasite (jusqu'à 40 % des AAL, **Fig. 3.11**), tout au long de son développement. La question de la capacité de l'orobanche à métaboliser cet AAL particulier peut être posée sachant que l'analyse d'une banque d'ADNc de *P. ramosa* a permis de vérifier la présence d'une séquence homologue à celle d'*A. thaliana* codant pour une C-S lyase (alliinase) ; elle n'a pas pu être traitée dans cette étude de part l'indisponibilité à ce jour de ¹⁵N-SMCSO.

(ii) L'Asn s'est révélé être un AAL peu représenté dans les exsudats phloémiens foliaires et les organes du colza. De plus, l'infestation réduit considérablement sa teneur dans les exsudats phloémiens (**Fig. 3.6**). Par contre, l'Asn s'accumule très fortement à 30 jpp dans les tubercules et les hampes florales de l'orobanche, et représente ainsi un des 3 AAL majoritaires, avec le SMCSO et la Gln (**Fig. 3.11**). L'intensification de la synthèse d'Asn chez le parasite apparaît donc comme un processus majeur de stockage de l'azote en fin de développement, en complément de la Gln

et en moindre partie de l'Arg dont le taux augmente également. Chez les plantes, l'orientation du métabolisme azoté vers la production d'Asn (au détriment de celle de Gln) est une stratégie de gestion d'un excès d'azote (forte réduction du ratio C/N) et du risque de toxicité qu'il peut engendrer (Brouquisse *et al.*, 1992 ; Thum, 2003 ; Gaufichon *et al.*, 2010), par exemple dans les racines au cours de la période nocturne ("shift" du métabolisme du carbone) ou dans les feuilles sénescents au cours de la protéolyse (excès d'ammonium). Ainsi, la production massive d'Asn chez l'orobanche traduirait une situation critique de gestion d'un excès d'azote en fin de développement. Cette situation ne corrobore pas avec la réduction drastique du pool des AAL dans les exsudats phloémiens foliaires du colza hôte à cette période (**Fig. 3.6**) et suggère ainsi une forte mobilisation des protéines du parasite en fin de cycle. A ce titre, T. Péron (2010) a démontré l'importante hydrolyse de l'amidon des tubercules au cours de cette période, celle des protéines reste donc à être démontrée. L'accumulation d'Asn chez *P. ramosa* ne fut pas une réelle surprise. En effet, Abbes *et al.* (2009) ont également reporté une forte accumulation d'Asn chez *O. foetida* parasitant la fève. Néanmoins, cet AAL étant une forme azotée majeure de la sève phloémienne de la fève, son accumulation peut s'expliquer par un prélèvement chez l'hôte. De même, l'Asn représente plus de 80% des AAL des feuilles adultes de la plante hémiparasite de racines *Striga hermonthica* fixée sur Sorgho (Pageau *et al.*, 2003), l'Asn représentant dans ce cas la forme majeure d'assimilation des nitrates détournées massivement de la sève xylémienne racinaire de la plante hôte. La synthèse d'Asn en présence d'Asp est médiée chez les plantes par une Asn synthétase (AS, EC 6.3.5.4) utilisant majoritairement la Gln comme donneur de groupement amide et potentiellement le NH_4^+ . Ainsi, l'accumulation importante d'Asn observée à 30 jpp nécessite à cette période une forte disponibilité en Asp chez le parasite. A ce titre, le taux très élevé de malate dans les tubercules et les hampes florales pourrait traduire l'existence d'un métabolisme respiratoire intense, producteur d'Asp par le jeu d'aminotransférases.

(iii) Le saccharose est de loin le glucide majoritaire dans les exsudats phloémiens foliaires du colza, infesté ou non (**Fig. 3.8**). Cette forte représentativité, vis-à-vis des autres glucides et polyols, s'efface dans les tubercules et hampes florales de l'orobanche qui accumulent préférentiellement des hexoses et du mannitol, à tout stade de développement (**Fig. 3.13**). La force de puits du parasite vis-à-vis du saccharose issu du colza repose donc essentiellement sur l'hydrolyse du saccharose en hexoses, très probablement par une invertase acide vacuolaire (PrSAI1, EC 3.2.1.26), et leur conversion partielle en mannitol impliquant une mannose 6-phosphate réductase (PrM6PR, EC 1.1.1.224), à l'instar de *P. ramosa* parasitant la tomate (Delavault *et al.*, 2002 ; Draie *et al.*, 2011). La voie de biosynthèse du mannitol, ou d'un autre polyol, est par ailleurs un trait métabolique fortement conservé chez un grand nombre de plantes parasites (ou autres pathogènes de plantes) comme une stratégie efficace de conversion du saccharose prélevé chez la plante infestée (Simier *et al.*, 1993 ; Westwood, 2013).

(iv) Se pose également la question de l'utilisation des GLS par l'orobanche. En effet, les profils de GLS des exsudats phloémiens foliaires du colza et des tubercules d'orobanche (à 3 jpp) sont différents, révélant la capacité du parasite à métaboliser les glucosinolates issus du colza (**Fig. 3.9**). L'orobanche montre en effet la capacité à synthétiser des composés indoliques (GLS issus du tryptophane ; Magnus *et al.*, 1982). Cette conversion métabolique facilite ainsi la décharge des GLS dans les tissus puits des tubercules. Par ailleurs, la quantité d'azote contenue dans ces composés n'est pas négligeable comparé à celle des AAL ($2,5 \pm 0,42$ % et $4,6 \pm 0,32$ % de l'azote totale, respectivement à 3 jpp). Bien que ces analyses doivent être poursuivies avec la

quantification des GLS aux stades de développement ultérieurs (15 et 30 jpp), nos travaux soulignent le rôle significatif des GLS dans l'interaction colza - orobanche, au moins en sortie de vernalisation (3 jpp), comme source d'azote (et de soufre) pour la plante parasite. De même, les GLS sont des agents actifs dans la protection du colza vis-à-vis de ravageurs et pathogènes (Radojčić Redovniković *et al.*, 2008 ; van Dam *et al.*, 2008 ; Clay *et al.*, 2009 ; Hopkins *et al.*, 2009). De façon très intéressante, il a été récemment reporté que la cuscute, parasitant le colza, accumule également des GLS, qui affectent sensiblement le comportement sexué de populations de pucerons colonisateurs (Smith *et al.*, 2013). L'effet des GLS dans la protection de l'orobanche et la préférence d'hôtes mérite ainsi d'être précisé.

(v) Lors des analyses métabolomiques de la fraction « glucides, polyols et acides organiques », plusieurs composés sont restés indéterminés, et ce nettement plus fréquemment chez l'orobanche (**Fig. 3.13**). Ce constat souligne encore une fois la plus grande diversité métabolique du parasite aux regards de son statut emprunté de puits majeur dans l'interaction.

La mise au point d'une technique d'apport de composés azotés marqués (^{15}N isotopologues) aux jeunes tubercules d'orobanche et d'une méthode d'analyse UPLC-PDA-ESI-MS nécessaire au suivi de la métabolisation de ces composés nous a permis de caractériser plus finement le transfert de composés azotés via la racine hôte ainsi que leur métabolisation par le parasite.

D'une part, cette expérimentation nous a permis de suggérer que la Gln est bien une forme privilégiée de transport longue-distance chez le colza, que ce soit au niveau des exsudats phloémiens foliaires (**Fig. 3.5**) ou au niveau des racines (**Fig. 3.19**). D'autre part, nous avons pu vérifier l'inaptitude de jeunes tubercules d'orobanche à métaboliser le NO_3 . Ces résultats concordent avec le traçage ^{15}N montrant une première assimilation des nitrates dans le compartiment foliaire de l'hôte et notre incapacité à détecter une NRA dans de jeunes tubercules d'orobanche. D'autre part, nous avons pu vérifier l'aptitude de jeunes tubercules à métaboliser le NH_4 , mais également à prélever et accumuler de la Gln provenant d'une racine de colza hôte. Ces résultats préliminaires montrent bien l'adéquation de la technique mise au point pour l'étude du métabolisme azoté de l'orobanche rameuse et donne l'opportunité de suivre la métabolisation de tout ^{15}N isotopologue potentiellement véhiculé par le phloème racinaire du colza. Ainsi, il nous serait possible de vérifier l'aptitude de tubercules d'orobanche à métaboliser le SMCSO ou les GLS détectés dans les exsudats phloémiens foliaires, mais également de vérifier l'incorporation des AAL prélevés au sein des protéines de structure par l'analyse d'une hydrolyse acide de la fraction insoluble obtenue après extraction.

Conclusions générales et perspectives majeures

L'étude des mécanismes biologiques impliqués dans la mise en place et le développement de l'interaction *B. napus* - *P. ramosa* est une étape clef préliminaire à toute tentative de lutte ciblée. Étant donné l'importance de la nutrition azotée pour la culture extensive du colza d'hiver, et le constat d'une adaptation de l'orobanche rameuse à cet agrosystème dans un nombre croissant de territoires, ce travail de thèse avait pour objectif principal de définir la place de l'azote dans l'interaction en privilégiant trois axes d'investigations : (i) les relations fertilisation - sensibilité à l'orobanche ; (ii) les flux d'azote dans l'interaction et la variabilité génotypique chez le colza ; (iii) la métabolomique de l'interaction. Les résultats obtenus pour chacun de ces axes ont déjà fait l'objet d'une discussion et d'une proposition de perspectives majeures. La synthèse de l'ensemble des résultats obtenus n'est pas un exercice aisé. En se structurant sur les principales questions qui ont guidé ces travaux, elle a pour objectif de mettre en lumière les avancées majeures obtenues et proposer des perspectives de recherche plus larges.

- **Quel est l'impact de la fertilisation azotée sur la sensibilité de *Brassica napus* à *Phelipanche ramosa* ?**

Le premier choix fait dans cette étude a été de focaliser les investigations sur l'impact d'une carence nutritionnelle au cours des premiers stades de développement du colza. Les travaux de Gauthier *et al.* (2012), en complément des observations au champ, avaient effectivement souligné la précocité de la période de sensibilité du colza à l'orobanche rameuse. Le système de culture de l'interaction en système mini-rhizotron s'est donc révélé parfaitement adapté à cet objectif. Le second choix a été d'élargir les investigations aux nutriments N, S et P, avec la mise en œuvre de carences totales, au vu des interrelations N et S chez les plantes, notamment chez le colza, et l'impact du P sur l'exsudation de stimulants de germination de l'orobanche par les plantes hôtes.

Nos travaux montrent que l'azote occupe une place importante dans la mise en œuvre et le développement de l'interaction, avec des résultats en faveur non seulement d'un contrôle positif sur l'assimilation du soufre, la remobilisation précoce des réserves soufrées cotylédonaire vers les racines, la teneur en 2-PEITC dans la rhizosphère et la capacité du colza à soutenir le développement post-fixation de l'orobanche, mais aussi d'un contrôle négatif sur l'exsudation racinaire de SLs et l'expression d'une résistance précoce à la fixation du parasite. Ainsi, la fertilisation azotée, parfois en lien avec celle du soufre, accroît la sensibilité du colza à l'orobanche en favorisant la germination, la fixation aux racines et la croissance post-fixation de la plante parasite. Les perspectives majeures qui se dégagent de notre étude sont des travaux visant à démontrer l'importance de la remobilisation précoce du soufre cotylédonaire et de l'exsudation racinaire des glucosinolates dans la capacité du colza à induire la germination des graines d'orobanche, et des travaux sur les mécanismes de défense induits par la carence azotée et le rôle du jasmonate dans cette induction. De façon très intéressante, la mise en œuvre de différents régimes en P a également révélé un rôle significatif, inattendu, du phosphate dans le développement du puits parasitaire, qu'il reste à éclaircir. Le contrôle négatif du P dans la synthèse et l'exsudation des SLs a été reporté chez de nombreuses plantes hôtes, nos résultats

suggèrent également un tel rôle chez le colza. Par contre, l'effet positif du P, supposé ici direct, sur le développement post-fixation de l'orobanche n'avait pas été reporté jusqu'à aujourd'hui.

- **Quel est l'impact de l'orobanche sur le schéma d'utilisation de l'azote chez le colza ?**

Nos travaux ont permis également de caractériser les flux d'azote globaux au sein de l'interaction entre une variété de colza très sensible (ES Alienor) et l'orobanche rameuse. Bien qu'il soit difficile de transposer la fertilisation réalisée en pots dans cette étude avec un régime azoté au champ, les apports de solution nutritive effectués correspondraient à un régime de fertilisation élevé, de l'ordre de 250 kg N ha^{-1} . Dans ces conditions, et de façon concordante avec l'impact positif de l'azote sur la sensibilité du colza à l'orobanche, cette variété de colza se caractérise par une sensibilité précoce à l'orobanche rameuse et par une capacité à soutenir le développement de l'orobanche avant et pendant la vernalisation. Dans ces conditions, le puits parasitaire est dominant en sortie de vernalisation par rapport aux propres puits du colza vis-à-vis notamment de l'azote foliaire nouvellement assimilé pendant cette période, limitant ainsi très fortement le développement post-vernalisation du colza. Ceci contraste avec le très faible impact de l'infestation sur le développement du colza avant vernalisation et avant la reprise de croissance post-vernalisation, soulignant la mise en place de mécanismes de compensation de la productivité pendant cette période, incluant l'augmentation des capacités d'absorption racinaire des nitrates et une sénescence foliaire retardée en réponse à l'infestation. A ce titre, l'hypothèse de l'absence d'un rétrocontrôle de l'absorption racinaire en pré-vernalisation et avant la reprise de croissance par l'accumulation d'acides aminés, en raison des prélèvements effectués par la plante parasite, mériterait d'être confirmée.

Cette étude a donc mis en lumière les relations source-puits vis-à-vis de l'azote au sein de l'interaction et de leur évolution au cours de la culture dans des conditions optimales, avec une très forte dominance du puits parasitaire en post-vernalisation mettant très probablement les puits du colza en carence nutritionnelle. Il serait intéressant maintenant d'évaluer l'impact de facteurs environnementaux majeurs sur ces relations source-puits, en lien avec l'évolution programmée des conditions climatiques et culturales, tels qu'une faible disponibilité en eau ou en azote et des moyennes de température plus élevées. Les résultats obtenus en système mini-rhizotrons en condition de carence azotée suggèrent un effet bénéfique d'une faible disponibilité en azote sur la protection du colza vis-à-vis de l'orobanche, qu'il reste néanmoins à démontrer sur des temps de culture plus longs englobant les périodes de vernalisation et de post-vernalisation jusqu'à fructification.

La génétique du colza peut également contrôler les relations source-puits vis-à-vis de l'azote au sein de l'interaction, comme démontré dans cette étude avec la variété partiellement résistante Shakira. Même si la biomasse du puits parasitaire est équivalente en fin de culture sur les variétés ES Alienor et Shakira, la tolérance de cette dernière repose sur sa capacité à contrôler négativement le développement post-fixation de l'orobanche jusqu'à floraison, orientant ainsi pendant une très longue période les flux d'azote foliaire vers les puits foliaires et reproducteurs du colza. Les mécanismes impliqués dans le contrôle du puits parasitaire chez le colza var. Shakira devront être recherchés. L'hypothèse d'une implication de protéines FT du colza dans la régulation du développement des tubercules d'orobanche a été avancée dans cette

étude et méritera une attention particulière, de par son originalité et l'importance qu'elle pourrait revêtir sur les stratégies de sélection de tolérance du colza vis-à-vis de l'orobanche. Néanmoins, à notre connaissance, aucune relation simple entre la tolérance à l'orobanche et la précocité de floraison du colza « n'est remontée », à ce jour, des essais variétaux au champ.

- **Quels sont les particularités métaboliques de l'interaction ?**

L'analyse métabolomique de l'interaction a permis, tout d'abord, de mettre en lumière l'importance de trois aminoacides dans le schéma d'utilisation de l'azote du colza. Du fait de sa composition particulière (C, N, S), le SMCSO occupe une place centrale dans la remobilisation de l'azote et du soufre lors du développement végétatif et du remplissage des graines. La Pro est apparue comme étant une forme de stockage transitoire privilégiée de l'azote dans les organes tampons du colza. Enfin, la Gln s'avère être la forme préférentielle de transport longue-distance de l'azote lors de la remobilisation nécessaire au remplissage des graines. L'infestation ne modifie pas ces stratégies métaboliques, suggérant que l'orobanche n'est pas perçue comme un stress par le colza, ou que l'hôte met en place une sorte "d'acclimatation métabolique" aux conditions parasitaires.

Les autres résultats originaux issus de ces analyses métabolomiques soulignent l'accumulation par l'orobanche de métabolites spécifiques du colza, tels que le SMCSO et les GLS, mais aussi d'Asn, un composé très peu représenté dans le phloème du colza. La capacité du parasite à métaboliser le SMCSO conditionne l'intérêt de ce métabolite dans la remobilisation du C, N et S chez l'orobanche, en plus de son intérêt comme osmoticum. Celle-ci n'a pu être démontrée dans cette étude. Concernant les GLS, les formes majoritairement accumulées chez l'orobanche diffèrent de celles prélevées chez le colza, ce qui traduit la capacité du parasite à métaboliser ce type de composés. La question de l'intérêt de ces composés chez l'orobanche dans la remobilisation du S et de l'N mais aussi dans la protection contre les pathogènes est posée. Dans ce contexte, nos travaux révèlent une modification importante du profil des aminoacides dans les tubercules et hampes florales du parasite en fin de cycle de développement, avec une forte accumulation d'Asn. Cette orientation métabolique traduirait un schéma de gestion d'un excès d'azote en lien avec la mobilisation des réserves azotées (protéiques) du parasite, qu'il reste à démontrer.

Concernant les autres métabolites, les résultats obtenus démontrent l'existence chez l'orobanche rameuse parasitant le colza d'un métabolisme glucidique "classique" reposant sur la conversion du saccharose prélevée chez le colza en hexoses, mannitol et autres composés non identifiés. Au vu de l'accumulation quasiment ubiquitaire du saccharose dans la sève phloème des plantes, cette stratégie métabolique est donc fortement conservée chez les orobanches comme un des moteurs de la force de puits.

- **Quels sont les caractéristiques globales du schéma d'utilisation de l'azote de l'interaction ?**

Une grande partie de nos travaux a donc permis de définir le schéma d'utilisation de l'azote foliaire nouvellement assimilé en sortie de vernalisation au sein de l'interaction colza - orobanche. Suite à l'absorption racinaire par le colza, les nitrates sont véhiculés jusqu'aux feuilles de l'hôte, principal site de leur assimilation. Nos travaux (tests d'activité nitrate réductase, assimilation directe de $^{15}\text{NO}_3$ *in vitro*) soulignent en parallèle l'incapacité de l'orobanche à utiliser directement les nitrates, et donc son entière dépendance vis-à-vis des composés azotés réduits véhiculés par le phloème du colza. Il n'a pas été possible dans les études de traçage des flux de ^{15}N d'identifier les principales formes azotées marquées dans le phloème du colza (organique/inorganique). Néanmoins, les analyses métabolomiques ont permis de préciser l'identité des principaux aminoacides des exsudats phloémiens foliaires du colza, qui se distribuent entre les puits du colza et le puits parasite, voire exclusivement vers ce dernier dans le cas d'une interaction très propice au développement post-fixation de l'orobanche (colza var. ES Alienor). Les AAL ne sont pas les seuls composés azotés véhiculés dans le phloème du colza puisque des GLS sont également transportés et accumulés dans le parasite. Les différentes analyses de flux de ^{15}N réalisées dans cette étude ($^{15}\text{NO}_3$ / plantes entières, Gln / racines excisées de colza parasité) semblent néanmoins "aller dans le même sens" en soulignant l'incorporation plus ou moins rapide chez l'orobanche de l'azote issu du colza hôte dans des composés azotés insolubles (protéines de structure très probablement). Ces résultats devront être confirmés par des études plus approfondies.

Références bibliographiques

- Aalders AJG, Pieters R.** 1985. In vitro testing with 2, 3, 5 triphenyl tetrazolium chloride (TTC) of *Orobanche crenata* seed metabolism. Faba Bean Information Service (no.13) p. 35-37.
- Abbes Z, Kharrat M, Chaïbi W.** 2008. Seed germination and tubercle development of *Orobanche foetida* and *Orobanche crenata* in presence of different plant species. Tunisian Journal of Plant Protection **3**, 101.
- Abbes Z, Kharrat M, Delavault P, Chaïbi W, Simier P.** 2009a. Nitrogen and carbon relationships between the parasitic weed *Orobanche foetida* and susceptible and tolerant faba bean lines. Plant Physiology and Biochemistry **47**, 153–159.
- Abbes Z, Kharrat M, Delavault P, Chaïbi W, Simier P.** 2009b. Osmoregulation and nutritional relationships between *Orobanche foetida* and faba bean. Plant Signaling & Behavior **4**, 336–338.
- Abbes Z, Kharrat M, Delavault P, Simier P, Chaïbi W.** 2007. Field evaluation of the resistance of some faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes to the parasitic weed *Orobanche foetida* Poiret. Crop Protection **26**, 1777–1784.
- Abdallah M, Dubousset L, Meuriot F, Etienne P, Avice JC, Ourry A.** 2010. Effect of mineral sulphur availability on nitrogen and sulphur uptake and remobilization during the vegetative growth of *Brassica napus* L. Journal of experimental botany **61**, 2635–2646.
- Abdallah M, Etienne P, Ourry A, Meuriot F.** 2011. Do initial S reserves and mineral S availability alter leaf S-N mobilization and leaf senescence in oilseed rape? Plant Science **180**, 511–520.
- Aber M, Fer A, Sallé G.** 1983. Etude du transfert des substances organiques de l'hôte (*Vicia faba*) vers le parasite (*Orobanche crenata* Forsk.): Transfer of Organic Substances From the Host Plant *Vicia faba* to the Parasite *Orobanche crenata* Forsk. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie **112**, 297–308.
- Adams MA, Chen Z, Landman P, Colmer TD.** 1999. Simultaneous determination by capillary gas chromatography of organic acids, sugars, and sugar alcohols in plant tissue extracts as their trimethylsilyl derivatives. Analytical biochemistry **266**, 77–84.
- Agüera E, Cabello P, de la Haba P.** 2010. Induction of leaf senescence by low nitrogen nutrition in sunflower (*Helianthus annuus*) plants. Physiologia Plantarum **138**, 256–267.
- Akiyama H, Yan X, Yagi K.** 2006. Estimations of emission factors for fertilizer-induced direct N₂O emissions from agricultural soils in Japan: Summary of available data. Soil Science and Plant Nutrition **52**, 774–787.
- Albert B, Le Cahérec F, Niogret MF, Faes P, Avice JC, Leport L, Bouchereau A.** 2012. Nitrogen availability impacts oilseed rape (*Brassica napus* L.) plant water status and proline production efficiency under water-limited conditions. Planta, 1–18.
- Alboresi A, Gestin C, LEYDECKER M-T, Bedu M, Meyer C, TRUONG H-N.** 2005. Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. Plant, cell & environment **28**, 500–512.
- Alcázar R, Altabella T, Marco F, Bortolotti C, Reymond M, Koncz C, Carrasco P, Tiburcio AF.** 2010. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. Planta **231**, 1237–1249.

- Ali IA, Kafkafi U, Yamaguchi I, Sugimoto Y, Inanaga S.** 1998. Response of oilseed rape plant to low root temperature and nitrate: Ammonium ratios. *Journal of Plant Nutrition* **21**, 1463–1481.
- Aly R.** 2007. Conventional and biotechnological approaches for control of parasitic weeds. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **43**, 304–317.
- Aly R.** 2013. Trafficking of molecules between parasitic plants and their hosts (M Vurro, Ed.). *Weed Research*, **53**, 231-241.
- Aly R, Cholakh H, Joel DM, Leibman D, Steinitz B, Zelcer A, Naglis A, Yarden O, Gal-On A.** 2009. Gene silencing of mannose 6-phosphate reductase in the parasitic weed *Orobanchae aegyptiaca* through the production of homologous dsRNA sequences in the host plant. *Plant Biotechnology Journal* **7**, 487–498.
- Aly R, Hamamouch N, Abu-Nassar J, Wolf S, Joel DM, Eizenberg H, Kaisler E, Cramer C, Gal-On A, Westwood JH.** 2011. Movement of protein and macromolecules between host plants and the parasitic weed *Phelipanche aegyptiaca* Pers. *Plant cell reports* **30**, 2233–2241.
- Aly R, Plakhin D, Achdari G.** 2005. Expression of sarcotoxin IA gene via a root-specific tob promoter enhanced host resistance against parasitic weeds in tomato plants. *Plant Cell Reports* **25**, 297–303.
- Aly R, Westwood J, Cramer C.** 2003. Crop protection against parasites/pathogens through expression of sarcotoxin-like peptide. Patent no. WO02094008.
- Andolfi A, Boari A, Evidente A, Vurro M.** 2005. Metabolites Inhibiting Germination of *Orobanchae ramosa* Seeds Produced by *Myrothecium verrucaria* and *Fusarium compactum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 1598–1603.
- Andreasson E, Jorgensen LB, Hoglund A-S, Rask L, Meijer J.** 2001. Different Myrosinase and Idioblast Distribution in *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *PLANT PHYSIOLOGY* **127**, 1750–1763.
- Andrews M.** 1986. The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant, Cell & Environment* **9**, 511–519.
- Araya T, Noguchi K, Tarashima I.** 2006. Effects of Carbohydrate Accumulation on Photosynthesis Differ between Sink and Source Leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Cell Physiology* **47**, 644–652.
- Armenta JM, Cortes DF, Pisciotta JM, Shuman JL, Blakeslee K, Rasoloson D, Ogunbiyi O, Sullivan DJ, Shulaev V.** 2010. Sensitive and Rapid Method for Amino Acid Quantitation in Malaria Biological Samples Using AccQ•Tag Ultra Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-MS/MS with Multiple Reaction Monitoring. *Analytical Chemistry* **82**, 548–558.
- Asare E, Scarisbrick DH.** 1995. Rate of nitrogen and sulphur fertilizers on yield, yield components and seed quality of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Field Crops Research* **44**, 41–46.
- Aslam M, Travis RL, Huffaker RC.** 1995. Effect of pH and calcium on short-term NO₃-fluxes in roots of barley seedlings. *Plant physiology* **108**, 727–734.

- Auger B, Pouvreau J-B, Pouponneau K, Yoneyama K, Montiel G, Le Bizec B, Yoneyama K, Delavault P, Delourme R, Simier P.** 2012. Germination stimulants of *Phelipanche ramosa* in the rhizosphere of *Brassica napus* are derived from the glucosinolate pathway. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 120314052115002.
- Ausin I, Alonso-Blanco C, Martinez-Zapater J-M.** 2005. Environmental regulation of flowering. *The International Journal of Developmental Biology* **49**, 689–705.
- Awad AA, Sato D, Kusumoto D, Kamioka H, Takeuchi Y, Yoneyama K.** 2006. Characterization of Strigolactones, Germination Stimulants for the Root Parasitic Plants *Striga* and *Orobancha*, Produced by Maize, Millet and Sorghum. *Plant Growth Regulation* **48**, 221–227.
- Ayongwa GC, Stomph TJ, Emechebe AM, Kuyper TW.** 2006. Root nitrogen concentration of sorghum above 2% produces least *Striga hermonthica* seed stimulation. *Annals of applied biology* **149**, 255–262.
- Badri DV, Vivanco JM.** 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment* **32**, 666–681.
- Baird MV, Riopel JL.** 1985. Surface characteristics of root and haustorial hairs of parasitic *Scrophulariaceae*. *Bot. Gaz* **146**, 63–9.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM.** 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 233–266.
- Balint T, Rengel Z.** 2011. Amino acid composition of xylem and phloem sap varies in canola genotypes differing in nitrogen- and sulfur-use efficiency. *Crop and Pasture Science* **62**, 198–207.
- Barbosa JM, Singh NK, Cherry JH, Locy RD.** 2010. Nitrate uptake and utilization is modulated by exogenous γ -aminobutyric acid in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 443–450.
- Barciszewski J, Maciej S, Haertlé T.** 2000. Minireview: analysis of rape seed napin structure and potential roles of the storage protein. *Journal of Protein Chemistry* **19**, 249–254.
- Barker ER, Press MC, Scholes JD, Quick WP.** 1996. Interactions between the parasitic angiosperm *Orobancha aegyptiaca* and its tomato host: growth and biomass allocation. *New Phytologist* **133**, 637–642.
- Barkman TJ, McNeal JR, Lim S-H, Coat G, Croom HB, Young ND, dePamphilis CW.** 2007. Mitochondrial DNA suggests at least 11 origins of parasitism in angiosperms and reveals genomic chimerism in parasitic plants. *BMC Evolutionary Biology* **7**, 248.
- Bar-Nun N.** 2003. Changes in the activity of the alternative oxidase in *Orobancha* seeds during conditioning and their possible physiological function. *Phytochemistry* **64**, 235–241.
- Bar-Nun N, Mayer AM.** 1993. Preconditioning and germination of *Orobancha* seeds: Respiration and protein synthesis. *Phytochemistry* **34**, 39–45.
- Bar-Nun N, Mayer AM.** 2002. Composition of and changes in storage compounds in *Orobancha aegyptiaca* seeds during preconditioning. *Israel Journal of Plant Sciences* **50**, 278–279.

- Bar-Nun N, Sachs T, Mayer AM.** 2008. A Role for IAA in the Infection of *Arabidopsis thaliana* by *Orobanche aegyptiaca*. *Annals of Botany* **101**, 261–265.
- Barry TN.** 2013. The feeding value of forage brassica plants for grazing ruminant livestock. *Animal Feed Science and Technology* **181**, 15–25.
- Bauwe H, Hagemann M, Fernie AR.** 2010. Photorespiration: players, partners and origin. *Trends in Plant Science* **15**, 330–336.
- Beare JL, Campbell JA, Youngs CG, Craig BM.** 1963. Effects of saturated fat in rats fed rapeseed oil. *Canadian journal of biochemistry and physiology* **41**, 605–612.
- Becker A.** 2011. The involvement of aquaporins in ammonia/ammonium transport across root cell membranes of barley (*Hordeum vulgare* L.).
- Bell JM.** 1984. Nutrients and toxicants in rapeseed meal: a review. *Journal of animal science* **58**, 996–1010.
- Benharrat H, Boulet C, Theodet C, Thalouarn P.** 2005. Virulence diversity among branched broomrape (*O. ramosa* L.) populations in France. *Agronomy for Sustainable Development* **25**, 123–128.
- Benharrat H, Veronesi C, Theodet C, Thalouarn P.** 2002. *Orobanche* species and population discrimination using intersimple sequence repeat (ISSR). *Weed Research* **42**, 470–475.
- Bennett JR, Mathews S.** 2006. Phylogeny of the parasitic plant family *Orobanchaceae* inferred from phytochrome A. *American Journal of Botany* **93**, 1039–1051.
- Bernard SM, Habash DZ.** 2009. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytologist* **182**, 608–620.
- Berry PM, Spink J, Foulkes MJ, White PJ.** 2010. The physiological basis of genotypic differences in nitrogen use efficiency in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Field Crops Research* **119**, 365–373.
- Beuve N, Rispaïl N, Laine P, CLIQUET JB, Ourry A, Le Deunff E.** 2004. Putative role of gamma-aminobutyric acid (GABA) as a long-distance signal in up-regulation of nitrate uptake in *Brassica napus* L. *Plant, Cell & Environment* **27**, 1035–1046.
- Birschwilks M.** 2006. Transfer of phloem-mobile substances from the host plants to the holoparasite *Cuscuta* sp. *Journal of Experimental Botany* **57**, 911–921.
- Blake-Kalff MM., Harrison KR, Hawkesford MJ, Zhao FJ, McGrath SP.** 1998. Distribution of sulfur within oilseed rape leaves in response to sulfur deficiency during vegetative growth. *Plant physiology* **118**, 1337–1344.
- Blake-Kalff MMA, Hawkesford MJ, Zhao FJ, McGrath SP.** 2000. Diagnosing sulfur deficiency in field-grown oilseed rape (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant and soil* **225**, 95–107.
- Bleischwitz M, Albert M, Fuchsbauer H-L, Kaldenhoff R.** 2010. Significance of Cuscutain, a cysteine protease from *Cuscuta reflexa*, in host-parasite interactions. *BMC plant biology* **10**, 227.

- Boari A, Vurro M.** 2004. Evaluation of *Fusarium* spp. and other fungi as biological control agents of broomrape (*Orobancha ramosa*). *Biological Control* **30**, 212–219.
- Borg SJ ter.** 1986. Effects of environmental factors on *Orobancha*-host relationships; a review and some recent results. Landbouwniversiteit, .
- Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J.** 1999. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science* **140**, 103–125.
- Boughton BA, Callahan DL, Silva C, Bowne J, Nahid A, Rupasinghe T, Tull DL, McConville MJ, Bacic A, Roessner U.** 2011. Comprehensive Profiling and Quantitation of Amine Group Containing Metabolites. *Analytical Chemistry* **83**, 7523–7530.
- Boulet C, Labrousse P, Arnaud MC, Zehhar N, Fer A.** 2001. Weed species present various responses to *Orobancha ramosa*. Proceedings of the seventh international parasitic Weed Symposium. Faculté des Sciences de Nantes.228–231.
- Boulet C, Pineault D, Benharrat H, Bozec D, Delavault P, Simier P.** 2007. Adventices du colza et orobanche rameuse. 20ème conférence du COLUMA.
- Bouwmeester HJ, Matusova R, Zhongkui S, Beale MH.** 2003. Secondary metabolite signalling in host–parasitic plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 358–364.
- Bouwmeester HJ, Roux C, Lopez-Raez JA, Bécard G.** 2007. Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends in Plant Science* **12**, 224–230.
- Boyer F-D, de Saint Germain A, Pillot J-P, Pouvreau J-B, Chen VX, Ramos S, Stevenin A, Simier P, Delavault P, Beau J-M, et al.** 2012. Structure-Activity Relationship Studies of Strigolactone-Related Molecules for Branching Inhibition in Garden Pea: Molecule Design for Shoot Branching. *PLANT PHYSIOLOGY* **159**, 1524–1544.
- Boz Ö, Dogan MN, Ögüt D.** 2012. The effect of duration of solarization on controlling branched broomrape (*Phelipanche ramosa* L.) and some weed species. *Julius-Kühn-Archiv*, 687.
- Brault M, Betsou F, Jeune B, Tuquet C, Salle G.** 2007. Variability of *Orobancha ramosa* populations in France as revealed by cross infestations and molecular markers. *Environmental and Experimental Botany* **61**, 272–280.
- Brennan RF, Mason MG, Walton GH.** 2000. Effect of nitrogen fertilizer on the concentrations of oil and protein in canola (*Brassica napus*) seed. *Journal of Plant Nutrition* **23**, 339–348.
- Brenner WG, Romanov GA, Köllmer I, Bürkle L, Schmölling T.** 2005. Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *The Plant Journal* **44**, 314–333.
- Bressan M, Roncato MA, Bellvert F, Comte G, el Zahar Haichar F, Achouak W, Berge O.** 2009. Exogenous glucosinolate produced by *Arabidopsis thaliana* has an impact on microbes in the rhizosphere and plant roots. *The ISME journal* **3**, 1243–1257.
- Brewer PB, Koltai H, Beveridge CA.** 2012. Diverse Roles of Strigolactones in Plant Development. *Molecular Plant* **6**, 18–28.

- Britto D, Kronzucker H.** 2006. Futile cycling at the plasma membrane: a hallmark of low-affinity nutrient transport. *Trends in Plant Science* **11**, 529–534.
- Brotherson JD, Simmons BT, Ball T, Anderson WR.** 2005. Nutrient relationships between *Orobanche fasciculata* Nutt. and its host *Artemisia pygmaea* Gray in the Uinta basin of Utah, USA. *Western North American Naturalist* **65**, 242–247.
- Brouquisse R, James F, Pradet A, Raymond P.** 1992. Asparagine metabolism and nitrogen distribution during protein degradation in sugar-starved maize root tips. *Planta* **188**, 384–395.
- Brugière N, Dubois F, Masclaux C, Sangwan RS, Hirel B.** 2000. Immunolocalization of glutamine synthetase in senescing tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves suggests that ammonia assimilation is progressively shifted to the mesophyll cytosol. *Planta* **211**, 519–527.
- Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, Pink D.** 2003. The molecular analysis of leaf senescence—a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal* **1**, 3–22.
- Buschmann H, Gonsior G, Sauerborn J.** 2005. Pathogenicity of branched broomrape (*Orobanche ramosa*) populations on tobacco cultivars. *Plant Pathology* **54**, 650–656.
- Cabello P, Agüera E, de la Haba P.** 2006. Metabolic changes during natural ageing in sunflower (*Helianthus annuus*) leaves: expression and activity of glutamine synthetase isoforms are regulated differently during senescence. *Physiologia Plantarum* **128**, 175–185.
- Cabello P, De La Haba P, Gonzalez-Fontes A, Maldonado JM.** 1998. Induction of nitrate reductase, nitrite reductase, and glutamine synthetase isoforms in sunflower cotyledons as affected by nitrate, light, and plastid integrity. *Protoplasma* **201**, 1–7.
- Callejón RM, Troncoso AM, Morales ML.** 2010. Determination of amino acids in grape-derived products: A review. *Talanta* **81**, 1143–1152.
- Cameron DD, Hwangbo J-K, Keith AM, Geniez J-M, Kraushaar D, Rowntree J, Seel WE.** 2005. Interactions between the hemiparasitic angiosperm *Rhinanthus minor* and its hosts: From the cell to the ecosystem. *Folia Geobotanica* **40**, 217–229.
- Cameron DD, Seel WE.** 2007. Functional anatomy of haustoria formed by *Rhinanthus minor*: linking evidence from histology and isotope tracing. *New Phytologist* **174**, 412–419.
- Campbell WH.** 1999. Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annual review of plant biology* **50**, 277–303.
- Caputo C, Criado MV, Roberts IN, Gelso MA, Barneix AJ.** 2009. Regulation of glutamine synthetase 1 and amino acids transport in the phloem of young wheat plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**, 335–342.
- Castaigns L, Camargo A, Pocholle D, Gaudon V, Texier Y, Boutet-Mercey S, Taconnat L, Renou J-P, Daniel-Vedele F, Fernandez E, et al.** 2009. The nodule inception-like protein 7 modulates nitrate sensing and metabolism in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **57**, 426–435.
- Castaigns L, Marchive C, Meyer C, Krapp A.** 2010. Nitrogen signalling in *Arabidopsis*: how to obtain insights into a complex signalling network. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1391–1397.

- Castejon-Muñoz M, Romero-Muñoz F, Garcia-Torres L.** 1993. Effect of planting date on broomrape (*Orobancha cernua* Loefl.) infections in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Weed Research* **33**, 171–176.
- Castro Marín I, Loef I, Bartetzko L, Searle I, Coupland G, Stitt M, Osuna D.** 2010. Nitrate regulates floral induction in *Arabidopsis*, acting independently of light, gibberellin and autonomous pathways. *Planta* **233**, 539–552.
- Cerezo M, Tillard P, Filleur S, Muños S, Daniel-Vedele F, Gojon A.** 2001. Major Alterations of the Regulation of Root NO₃ – Uptake Are Associated with the Mutation of Nrt2.1 and Nrt2.2 Genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **127**, 262–271.
- Cernusak LA, Pate JS, Farquhar GD.** 2004. Oxygen and carbon isotope composition of parasitic plants and their hosts in southwestern Australia. *Oecologia* **139**, 199–213.
- Chacón-López A, Ibarra-Laclette E, Sánchez-Calderón L, Gutiérrez-Alanis D, Herrera-Estrella L.** 2011. Global expression pattern comparison between low phosphorus insensitive 4 and WT *Arabidopsis* reveals an important role of reactive oxygen species and jasmonic acid in the root tip response to phosphate starvation. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 382–392.
- Chae HS.** 2003. The eto1, eto2, and eto3 Mutations and Cytokinin Treatment Increase Ethylene Biosynthesis in *Arabidopsis* by Increasing the Stability of ACS Protein. *THE PLANT CELL ONLINE* **15**, 545–559.
- Chae SH, Yoneyama K, Takeuchi Y, Joel DM.** 2004. Fluridone and norflurazon, carotenoid-biosynthesis inhibitors, promote seed conditioning and germination of the holoparasite *Orobancha minor*. *Physiologia Plantarum* **120**, 328–337.
- Chamorro AM, Tamagno LN, Bezus R, Sarandón SJ.** 2002. Nitrogen accumulation, partition, and nitrogen-use efficiency in canola under different nitrogen availabilities. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **33**, 493–504.
- Chang M, Netzly DH, Butler LG, Lynn DG.** 1986. Chemical regulation of distance. Characterization of the first natural host germination stimulant for *Striga asiatica*. *Journal of the American Chemical Society* **108**, 7858–7860.
- Chen S, Petersen BL, Olsen CE, Schulz A, Halkier BA.** 2001. Long-distance phloem transport of glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **127**, 194–201.
- Chen Y, Schmelz EA, Wäckers F, Ruberson JR.** 2008. Cotton Plant, *Gossypium hirsutum* L., Defense in Response to Nitrogen Fertilization. *Journal of Chemical Ecology* **34**, 1553–1564.
- Chen B-M, Wang Z-H, Li S-X, Wang G-X, Song H-X, Wang X-N.** 2004. Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. *Plant Science* **167**, 635–643.
- Chiu C-C, Lin C-S, Hsia A-P, Su R-C, Lin H-L, Tsay Y-F.** 2004. Mutation of a nitrate transporter, AtNRT1: 4, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. *Plant and Cell Physiology* **45**, 1139–1148.
- Cipriani MG, Stea G, Moretti A, Altomare C, Mulè G, Vurro M.** 2009. Development of a PCR-based assay for the detection of *Fusarium oxysporum* strain FT2, a potential mycoherbicide of *Orobancha ramosa*. *Biological Control* **50**, 78–84.

- Clay NK, Adio AM, Denoux C, Jander G, Ausubel FM.** 2009. Glucosinolate metabolites required for an *Arabidopsis* innate immune response. *Science* **323**, 95–101.
- Cohen SA.** 2000. Amino Acid Analysis Using Precolumn Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate. In: Cooper C, Packer N, Williams K, eds. *Methods in Molecular Biology*TM. Amino Acid Analysis Protocols. Humana Press, 39–47.
- Cohen SA.** 2003. Amino acid analysis using pre-column derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. *Analysis of hydrolyzed proteins and electroblotted samples. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **211**, 143–154.
- Cohen M, Prandi C, Occhiato EG, Tabasso S, Winger S, Resnick N, Steinberger Y, Koltai H, Kapulnik Y.** 2013. Structure–Function Relations of Strigolactone Analogs: Activity as Plant Hormones and Plant Interactions. *Molecular Plant* **6**, 141–152.
- Colmer TD, Bloom AJ.** 1998. A comparison of NH_4^+ and NO_3^- net fluxes along roots of rice and maize. *Plant, Cell & Environment* **21**, 240–246.
- Cook CE, Whichard LP, Turner B, Wall ME, Egley GH.** 1966. Germination of Witchweed (*Striga lutea* Lour.): Isolation and Properties of a Potent Stimulant. *Science* **154**, 1189–1190.
- Cook CE, Whichard LP, Wall M, Egley GH, Coggon P, Luhan PA, McPhail AT.** 1972. Germination stimulants. II. Structure of strigol, a potent seed germination stimulant for witchweed (*Striga lutea*). *Journal of the American Chemical Society* **94**, 6198–6199.
- Cooper HD, Clarkson DT.** 1989. Cycling of Amino-Nitrogen and other Nutrients between Shoots and Roots in Cereals—A Possible Mechanism Integrating Shoot and Root in the Regulation of Nutrient Uptake. *Journal of Experimental Botany* **40**, 753–762.
- Coruzzi GM.** 2003. Primary N-assimilation into Amino Acids in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book* **31**, 1.
- Coskun D, Britto DT, Jean Y-K, Schulze LM, Becker A, Kronzucker HJ.** 2011. Silver ions disrupt K^+ homeostasis and cellular integrity in intact barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. *Journal of Experimental Botany* **63**, 151–162.
- Crawford NM, Forde BG.** 2002. Molecular and Developmental Biology of Inorganic Nitrogen Nutrition. *The Arabidopsis Book* **46**, 1.
- Crawford NM, Glass AD.** 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in plant science* **3**, 389–395.
- Crawford S, Shinohara N, Sieberer T, Williamson L, George G, Hepworth J, Muller D, Domagalska MA, Leyser O.** 2010. Strigolactones enhance competition between shoot branches by dampening auxin transport. *Development* **137**, 2905–2913.
- Cren M, Hirel B.** 1999. Glutamine synthetase in higher plants regulation of gene and protein expression from the organ to the cell. *Plant and Cell Physiology* **40**, 1187–1193.
- D’Hooghe P, Escamez S, Trouverie J, Avice J-C.** 2013. Sulphur limitation provokes physiological and leaf proteome changes in oilseed rape that lead to perturbation of sulphur, carbon and oxidative metabolisms. *BMC plant biology* **13**, 23.

- Dale H, Press MC.** 1998. Elevated atmospheric CO₂ influences the interaction between the parasitic angiosperm *Orobanche minor* and its host *Trifolium repens*. *New phytologist* **140**, 65–73.
- Van Dam NM, Tytgat TOG, Kirkegaard JA.** 2008. Root and shoot glucosinolates: a comparison of their diversity, function and interactions in natural and managed ecosystems. *Phytochemistry Reviews* **8**, 171–186.
- David-Schwartz R, Runo S, Townsley B, Machuka J, Sinha N.** 2008. Long-distance transport of mRNA via parenchyma cells and phloem across the host-parasite junction in *Cuscuta*. *New Phytologist* **179**, 1133–1141.
- Davies PJ.** 2010. The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. In: Davies PJ, ed. *Plant Hormones*. Springer Netherlands, 1–15.
- De Angeli A, Monachello D, Ephritikhine G, Frachisse JM, Thomine S, Gambale F, Barbier-Brygoo H.** 2006. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* **442**, 939–942.
- Dechorgnat J, Nguyen CT, Armengaud P, Jossier M, Diatloff E, Filleur S, Daniel-Vedele F.** 2010. From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1349–1359.
- Dechorgnat J, Patrit O, Krapp A, Fagard M, Daniel-Vedele F.** 2012. Characterization of the Nrt2.6 Gene in *Arabidopsis thaliana*: A Link with Plant Response to Biotic and Abiotic Stress (K Wu, Ed.). *PLoS ONE* **7**, e42491.
- Decroux J, Schwartz C, Muller J-C.** 2005. Guide de la fertilisation raisonnée : Grandes cultures et prairies. Editions France Agricole.
- Dejoux J-F, Recous S, Meynard J-M, Trinsoutrot I, Leterme P.** 2000. The fate of nitrogen from winter-frozen rapeseed leaves: mineralization, fluxes to the environment and uptake by rapeseed crop in spring. *Plant and Soil* **218**, 257–272.
- Delavault P, Simier P, Thoiron S, Véronési C, Fer A, Thalouarn P.** 2002. Isolation of mannose 6-phosphate reductase cDNA, changes in enzyme activity and mannitol content in broomrape (*Orobanche ramosa*) parasitic on tomato roots. *Physiologia Plantarum* **115**, 48–55.
- Delavault P, Thalouarn P.** 2002. The obligate root parasite *Orobanche cumana* exhibits several rbCL sequences. *Gene* **297**, 85–92.
- Denison FC, Paul A-L, Zupanska AK, Ferl RJ.** 2011. 14-3-3 proteins in plant physiology. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **22**, 720–727.
- Desclos M, Etienne P, Coquet L, Jouenne T, Bonnefoy J, Segura R, Reze S, Ourry A, Avice J-C.** 2009. A combined ¹⁵N tracing/proteomics study in *Brassica napus* reveals the chronology of proteomics events associated with N remobilisation during leaf senescence induced by nitrate limitation or starvation. *PROTEOMICS* **9**, 3580–3608.
- Desikan R, Griffiths R, Hancock J, Neill S.** 2002. A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 16314–16318.

- De Vega C, Berjano R, Arista M, Ortiz PL, Talavera S, Stuessy TF.** 2008. Genetic races associated with the genera and sections of host species in the holoparasitic plant *Cytinus* (*Cytinaceae*) in the Western Mediterranean basin. *New Phytologist* **178**, 875–887.
- Di HJ, Cameron KC, Shen JP, Winefield CS, O’Callaghan M, Bowatte S, He JZ.** 2009. Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen-rich grassland soils. *Nature Geoscience* **2**, 621–624.
- Diaz C, Kusano M, Sulpice R, Araki M, Redestig H, Saito K, Stitt M, Shin R.** 2011. Determining novel functions of *Arabidopsis* 14-3-3 proteins in central metabolic processes. *BMC systems biology* **5**, 192.
- Diaz C, Lemaitre T, Christ A, Azzopardi M, Kato Y, Sato F, Morot-Gaudry J-F, Le Dily F, Masclaux-Daubresse C.** 2008. Nitrogen Recycling and Remobilization Are Differentially Controlled by Leaf Senescence and Development Stage in *Arabidopsis* under Low Nitrogen Nutrition. *PLANT PHYSIOLOGY* **147**, 1437–1449.
- Díaz-Ruiz R, Torres AM, Satovic Z, Gutierrez MV, Cubero JI, Román B.** 2009. Validation of QTLs for *Orobanche crenata* resistance in faba bean (*Vicia faba* L.) across environments and generations. *Theoretical and Applied Genetics* **120**, 909–919.
- Die JV, Dita MA, Krajinski F, González-Verdejo CI, Rubiales D, Moreno MT, Román B.** 2007. Identification by suppression subtractive hybridization and expression analysis of *Medicago truncatula* putative defence genes in response to *Orobanche crenata* parasitization. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **70**, 49–59.
- Diepenbrock W.** 2000. Yield analysis of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): a review. *Field Crops Research* **67**, 35–49.
- Dongo A, Leflon M, Simier P, Delavault P.** 2011. Development of a high-throughput real-time quantitative PCR method to detect and quantify contaminating seeds of *Phelipanche ramosa* and *Orobanche cumana* in crop seed lots. *Weed Research*, no–no.
- Van Doorn WG.** 2008. Is the onset of senescence in leaf cells of intact plants due to low or high sugar levels? *Journal of Experimental Botany* **59**, 1963–1972.
- Dor E, Alperin B, Wininger S, Ben-Dor B, Somvanshi VS, Koltai H, Kapulnik Y, Hershenhorn J.** 2009. Characterization of a novel tomato mutant resistant to the weedy parasites *Orobanche* and *Phelipanche* spp. *Euphytica* **171**, 371–380.
- Dor E, Smironov E, Achdary G, Hershenhorn Y.** 2011a. Characterization of a novel tomato mutant HRT-1 resistant to acetolactate synthase inhibiting herbicides for broomrape management. *Proceedings of the 11th World Congress on Parasitic Plants*. Martina Franca, Italy, 101.
- Dor E, Yoneyama K, Wininger S, Kapulnik Y, Yoneyama K, Koltai H, Xie X, Hershenhorn J.** 2011b. Strigolactone deficiency confers resistance in tomato line SL-ORT1 to the parasitic weeds *Phelipanche* and *Orobanche* spp. *Phytopathology* **101**, 213–222.
- Dorca-Fornell C, Gregis V, Grandi V, Coupland G, Colombo L, Kater MM.** 2011. The *Arabidopsis* SOC1-like genes AGL42, AGL71 and AGL72 promote flowering in the shoot apical and axillary meristems: SOC1-like genes control floral transition. *The Plant Journal* **67**, 1006–1017.

- Dörr I.** 1996. New results on interspecific bridges between parasites and their hosts. *Congresos y Jornadas - Junta de Andalucía*. JA, DGIA, .
- Dörr I.** 1997. How *Striga* Parasitizes its Host: a TEM and SEM Study. *Annals of Botany* **79**, 463.
- Dörr I, Kollmann R.** 1975. Strukturelle Grundlagen des Parasitismus bei *Orobanche*. *Protoplasma* **83**, 185–199.
- Dörr I, Kollmann R.** 1976. Strukturelle Grundlagen des Parasitismus bei *Orobanche* III. Die Differenzierung des Xylemanschlusses bei *O. crenata*. *Protoplasma* **89**, 235–249.
- Dörr I, Kollmann R.** 1995. Symplasmic sieve element continuity between *Orobanche* and its host. *Botanica Acta* **108**, 47–55.
- Doyle SM, Diamond M, McCabe PF.** 2009. Chloroplast and reactive oxygen species involvement in apoptotic-like programmed cell death in *Arabidopsis* suspension cultures. *Journal of Experimental Botany* **61**, 473–482.
- Draie R.** 2009. Effet du greffage sur la productivité de la tomate en conditions de non infestation et d'infestation par l'orobranche: caractérisation d'une invertase acide, enzyme majeure de la force de puits du parasite.
- Draie R, Péron T, Pouvreau JB, Véronési C, Jégou S, Delavault P, Thoiron S, Simier P.** 2011. Invertases involved in the development of the parasitic plant *Phelipanche ramosa*: characterization of the dominant soluble acid isoform, PrSAI1. *Molecular Plant Pathology*.
- Dreccer MF, Schapendonk AHCM, van Oijen M, Pot CS, Rabbinge R.** 2000. Radiation and nitrogen use at the leaf and canopy level by wheat and oilseed rape during the critical period for grain number definition. *Functional Plant Biology* **27**, 899–910.
- Dubousset L, Abdallah M, Desfeux AS, Etienne P, Meuriot F, Hawkesford MJ, Gombert J, Segura R, Bataille M-P, Reze S, et al.** 2009. Remobilization of leaf S compounds and senescence in response to restricted sulphate supply during the vegetative stage of oilseed rape are affected by mineral N availability. *Journal of Experimental Botany* **60**, 3239–3253.
- Dubousset L, Etienne P, Avice JC.** 2010. Is the remobilization of S and N reserves for seed filling of winter oilseed rape modulated by sulphate restrictions occurring at different growth stages? *Journal of Experimental Botany* **61**, 4313–4324.
- Dun EA, de Saint Germain A, Rameau C, Beveridge CA.** 2012. Dynamics of Strigolactone Function and Shoot Branching Responses in *Pisum sativum*. *Molecular Plant* **6**, 128–140.
- Echevarria-Zomeno S, Perez-de-Luque A, Jorin J, Maldonado AM.** 2006. Pre-haustorial resistance to broomrape (*Orobanche cumana*) in sunflower (*Helianthus annuus*): cytochemical studies. *Journal of Experimental Botany* **57**, 4189–4200.
- Eizenberg H, Aly R, Cohen Y.** 2012. Technologies for Smart Chemical Control of Broomrape (*Orobanche* spp. and *Phelipanche* spp.). *Weed Science* **60**, 316–323.
- El Halmouch YH.** 2004. Recherche de mécanismes de résistance à l'orobranche chez des génotypes de tomate: aspects histologiques, physiologiques, moléculaires et génétiques.

- El-Beltagi HE-DS, Mohamed AA.** 2010. Variations in fatty acid composition, glucosinolate profile and some phytochemical contents in selected oil seed rape (*Brassica napus* L.) cultivars. *Grasas y aceites* **61**, 143–150.
- El-Maarouf-Bouteau H, Moreau E, Errakhi R, Sallé G.** 2008. A diffusible signal from germinating *Orobancha ramosa* elicits early defense responses in suspension-cultured *Arabidopsis thaliana*. *Plant signaling & behavior* **3**, 189–193.
- Engelsberger WR, Schulze WX.** 2012. Nitrate and ammonium lead to distinct global dynamic phosphorylation patterns when resupplied to nitrogen-starved *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal* **69**, 978–995.
- Etienne P, Desclos M, Le Gou L, Gombert J, Bonnefoy J, Maurel K, Le Dily F, Ourry A, Avice J-C.** 2007. N-protein mobilisation associated with the leaf senescence process in oilseed rape is concomitant with the disappearance of trypsin inhibitor activity. *Functional Plant Biology* **34**, 895–906.
- Evans RD.** 2001. Physiological mechanisms influencing plant nitrogen isotope composition. *Trends in Plant Science* **6**, 121–126.
- Evidente A, Abouzeid AM, Andolfi A, Cimmino A.** 2011a. Recent achievements in the bio-control of *Orobancha* infesting important crops in the Mediterranean basin. *J Agric Sci Technol A* **1**, 461–483.
- Evidente A, Andolfi A, Fiore M, Boari A, Vurro M.** 2006. Stimulation of *Orobancha ramosa* seed germination by fusicoccin derivatives: A structure–activity relationship study. *Phytochemistry* **67**, 19–26.
- Evidente A, Cimmino A, Fernández-Aparicio M, Andolfi A, Rubiales D, Motta A.** 2010. Polyphenols, Including the New Peapolyphenols A-C, from Pea Root Exudates Stimulate *Orobancha foetida* Seed Germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 2902–2907.
- Evidente A, Cimmino A, Fernández-Aparicio M, Rubiales D, Andolfi A, Melck D.** 2011b. Soyasapogenol B and trans-22-dehydrocampesterol from common vetch (*Vicia sativa* L.) root exudates stimulate broomrape seed germination. *Pest Management Science* **67**, 1015–1022.
- Evidente A, Fernández-Aparicio M, Andolfi A, Rubiales D, Motta A.** 2007. Trigoxazonane, a monosubstituted trioxazonane from *Trigonella foenum-graecum* root exudate, inhibits *Orobancha crenata* seed germination. *Phytochemistry* **68**, 2487–2492.
- Evidente A, Fernández-Aparicio M, Cimmino A, Rubiales D, Andolfi A, Motta A.** 2009. Peagol and peagoldione, two new strigolactone-like metabolites isolated from pea root exudates. *Tetrahedron Letters* **50**, 6955–6958.
- Fales SL, Gustine DL, Bosworth SC, Hoover RJ.** 1987. Concentrations of Glucosinolates and S-Methylcysteine Sulfoxide in Ensiled Rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Dairy Science* **70**, 2402–2405.
- Falk KL, Tokuhisa JG, Gershenzon J.** 2007. The Effect of Sulfur Nutrition on Plant Glucosinolate Content: Physiology and Molecular Mechanisms. *Plant Biology* **9**, 573–581.

- Fan X, Gordon-Weeks R, Shen Q, Miller AJ.** 2006. Glutamine transport and feedback regulation of nitrate reductase activity in barley roots leads to changes in cytosolic nitrate pools. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1333–1340.
- Fan S-C, Lin C-S, Hsu P-K, Lin S-H, Tsay Y-F.** 2009. The *Arabidopsis* Nitrate Transporter NRT1.7, Expressed in Phloem, Is Responsible for Source-to-Sink Remobilization of Nitrate. *THE PLANT CELL ONLINE* **21**, 2750–2761.
- Farquhar GD, Ehleringer JR, Hubick KT.** 1989. Carbon Isotope Discrimination and Photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**, 503–537.
- Faure-Rabasse S, Le Deunff E, Laine P, Macduff JH, Ourry A.** 2002. Effects of nitrate pulses on BnNRT1 and BnNRT2 genes: mRNA levels and nitrate influx rates in relation to the duration of N deprivation in *Brassica napus* L. *J. Exp. Bot.* **53**, 1711–1721.
- Feild TS, Brodribb TJ.** 2005. A unique mode of parasitism in the conifer coral tree *Parasitaxus ustus* (*Podocarpaceae*). *Plant, Cell & Environment* **28**, 1316–1325.
- Feller U, Anders I, Mae T.** 2007. Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *Journal of Experimental Botany* **59**, 1615–1624.
- Fernández-Aparicio M.** 2008. Identification of sources of resistance to crenate broomrape (*Orobanche crenata*) in Spanish lentil (*Lens culinaris*) germplasm. *Weed Research* **48**, 85–94.
- Fernández-Aparicio M, Moral A, Kharrat M, Rubiales D.** 2012. Resistance against broomrapes (*Orobanche* and *Phelipanche* spp.) in faba bean (*Vicia faba*) based in low induction of broomrape seed germination. *Euphytica* **186**, 897–905.
- Fernández-Aparicio M, Sillero JC, Rubiales D.** 2009. Resistance to broomrape species (*Orobanche* spp.) in common vetch (*Vicia sativa* L.). *Crop Protection* **28**, 7–12.
- Fernández-Martínez JM, Domínguez J, Pérez-Vich B.** 2008. Update on breeding for resistance to sunflower broomrape. *Helia* **31**, 73–84.
- Fernández-Martínez JM, Domínguez J, Pérez-Vich B, Velasco L.** 2010. Update on breeding for resistance to sunflower broomrape. *Helia* **33**, 1–11.
- Fernández-Martínez JM, Velasco L, Pérez-Vich B.** 2012. Progress in research on breeding for resistance to sunflower broomrape. *Helia* **35**, 47–56.
- Fettke J, Eckermann N, Kötting O, Ritte G, Steup M.** 2007. Novel starch-related enzymes and carbohydrates. *Cell Mol Biol* **52**, OL883–OL904.
- Finnemann J, Schjoerring JK.** 1999. Translocation of NH_4^+ in oilseed rape plants in relation to glutamine synthetase isogene expression and activity. *Physiologia Plantarum* **105**, 469–477.
- Finnemann J, Schjoerring JK.** 2000. Post-translational regulation of cytosolic glutamine synthetase by reversible phosphorylation and 14-3-3 protein interaction. *The Plant Journal* **24**, 171–181.
- Fischer NH, Weidenhamer JD, Bradow JM.** 1989. Dihydroparthenolide and other sesquiterpene lactones stimulate witchweed germination. *Phytochemistry* **28**, 2315–2317.

- Fismes J, Vong P, Guckert A, Frossard E.** 2000. Influence of sulfur on apparent N-use efficiency, yield and quality of oilseed rape (*Brassica napus* L.) grown on a calcareous soil. *European Journal of Agronomy* **12**, 127–141.
- Foo E, Yoneyama K, Hugill C, Quittenden LJ, Reid JB.** 2013. Strigolactones: Internal and external signals in plant symbioses? *Plant Signaling & Behavior* **8**, e23168.
- Foyer CH, Noctor G.** 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & redox signaling* **11**, 861–905.
- Franzaring J, Gensheimer G, Weller S, Schmid I, Fangmeier A.** 2012. Allocation and remobilisation of nitrogen in spring oilseed rape (*Brassica napus* L. cv. Mozart) as affected by N supply and elevated CO₂. *Environmental and Experimental Botany* **83**, 12–22.
- Franzaring J, Weller S, Schmid I, Fangmeier A.** 2011. Growth, senescence and water use efficiency of spring oilseed rape (*Brassica napus* L. cv. Mozart) grown in a factorial combination of nitrogen supply and elevated CO₂. *Environmental and Experimental Botany* **72**, 284–296.
- Friedrich JW, Schrader LE.** 1978. Sulfur deprivation and nitrogen metabolism in maize seedlings. *Plant Physiology* **61**, 900–903.
- Gabrielle B, Denoroy P, Gosse G, Justes E, Andersen MN.** 1998. A model of leaf area development and senescence for winter oilseed rape. *Field Crops Research* **57**, 209–222.
- Galindo JCG, de Luque AP, Jorrín J, Macías FA.** 2002. SAR Studies of Sesquiterpene Lactones as *Orobanche cumana* Seed Germination Stimulants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 1911–1917.
- Gal-On A, Naglis A, Leibman D, Ziadna H, Kathiravan K, Papayiannis L, Holdengreber V, Guenoune-Gelbert D, Lapidot M, Aly R.** 2009. Broomrape can acquire viruses from its hosts. *Phytopathology* **99**, 1321–1329.
- Gan S, Amasino RM.** 1997. Making Sense of Senescence (Molecular Genetic Regulation and Manipulation of Leaf Senescence). *Plant Physiology* **113**, 313.
- Gansel X, Muñoz S, Tillard P, Gojon A.** 2001. Differential regulation of the NO₃⁻ and NH₄⁺ transporter genes AtNrt2.1 and AtAmt1.1 in *Arabidopsis*: relation with long-distance and local controls by N status of the plant. *The Plant Journal* **26**, 143–155.
- Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A.** 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 711–724.
- Gas E, Flores-Perez U, Sauret-Gueto S, Rodriguez-Concepcion M.** 2009. Hunting for Plant Nitric Oxide Synthase Provides New Evidence of a Central Role for Plastids in Nitric Oxide Metabolism. *THE PLANT CELL ONLINE* **21**, 18–23.
- Gaspar M, Bousser A, Sissoëff I, Roche O, Hoarau J, Mahé A.** 2003. Cloning and characterization of ZmPIP1-5b, an aquaporin transporting water and urea. *Plant Science* **165**, 21–31.

- Gaufichon L, Masclaux-Daubresse C, Tcherkez G, Reisdorf-Cren M, Sakakibara Y, Hase T, Clément G, Avice J-C, Grandjean O, Marmagne A, et al.** 2013. *Arabidopsis thaliana* ASN2 encoding asparagine synthetase is involved in the control of nitrogen assimilation and export during vegetative growth: Nitrogen assimilation and translocation. *Plant, Cell & Environment* **36**, 328–342.
- Gaufichon L, Reisdorf-Cren M, Rothstein SJ, Chardon F, Suzuki A.** 2010. Biological functions of asparagine synthetase in plants. *Plant Science* **179**, 141–153.
- Gauthier M.** 2012. Etude et caractérisation des mécanismes de résistance de *Brassica napus* (colza, *Brassicaceae*) vis-à-vis de la plante parasite *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel (*Orobanchaceae*).
- Gauthier PPG, Lamothe M, Mahé A, Molero G, Nogués S, Hodges M, Tcherkez G.** 2012a. Metabolic origin of $\delta^{15}\text{N}$ values in nitrogenous compounds from *Brassica napus* L. leaves. *Plant, Cell & Environment* **36**, 128–137.
- Gauthier M, Véronési C, El-Halmouch Y, Leflon M, Jestin C, Labalette F, Simier P, Delourme R, Delavault P.** 2012b. Characterisation of resistance to branched broomrape, *Phelipanche ramosa*, in winter oilseed rape. *Crop Protection* **42**, 56–63.
- Gazzarrini S, Lejay L, Gojon A, Ninnemann O, Frommer WB, von Wirén N.** 1999. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell Online* **11**, 937–947.
- Georgieva EA, Dimitrova-Kostova ZS.** 1984. Determination of substances with isothiocyanic structure in the meals from the seeds of some plant species provoking the germination of the seeds of the broomrape (*Orobanche ramosa* L., *Orobanche mutelli* Schulz). *Comptes rendus de l'Académie Bulgare des Sciences* **37**.
- Gerendás J, Zhu Z, Bendixen R, Ratcliffe RG, Sattelmacher B.** 1997. Physiological and Biochemical Processes Related to Ammonium Toxicity in Higher Plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **160**, 239–251.
- Ghannam I.** 2012. The Effect of Herbicides on the Egyptian Broomrape (*Orobanche aegyptiaca*;) in Tomato Fields. *American Journal of Plant Sciences* **03**, 346–352.
- Gibot-Leclerc S, Brault M, Pinochet X, Sallé G.** 2003. Rôle potentiel des plantes adventices du colza d'hiver dans l'extension de l'orobanche rameuse en Poitou-Charentes. Potential role of winter rape weeds in the extension of broomrape in Poitou-Charentes. *Comptes Rendus Biologies* **326**, 645–658.
- Gibot-Leclerc S, Corbineau F, Sallé G, Côme D.** 2004. Responsiveness of *Orobanche ramosa* L. Seeds to GR 24 as Related to Temperature, Oxygen Availability and Water Potential During Preconditioning and Subsequent Germination. *Plant Growth Regulation* **43**, 63–71.
- Gibot-Leclerc S, Dessaint F, Reibel C, Le Corre V.** 2013. *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel populations differ in life-history and infection response to hosts. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **208**, 247–252.
- Gibot-Leclerc S, Pinochet X, Sallé G.** 2006. L'orobanche rameuse (*Orobanche ramosa* L.) du colza : un risque émergeant sous surveillance. *OCL* **13**, 200–5.

- Gibot-Leclerc S, Sallé G, Reboud X, Moreau D.** 2012. What are the traits of *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel that contribute to the success of its biological cycle on its host *Brassica napus* L.? *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **207**, 512–521.
- Gifford ML, Dean A, Gutierrez RA, Coruzzi GM, Birnbaum KD.** 2008. Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 803–808.
- Ginman EL.** 2009. Dispersal biology of *Orobancha ramosa* in South Australia.
- Girin T, Lejay L, Wirth J, Widiez T, Palenchar PM, Nazoa P, Touraine B, Gojon A, Lepetit M.** 2007. Identification of a 150bp cis-acting element of the AtNRT2.1 promoter involved in the regulation of gene expression by the N and C status of the plant. *Plant, Cell & Environment* **30**, 1366–1380.
- Giriram KM, Indira JA, Jeyaraaj R, Loganathan P.** 2006. Antimicrobial activity of aqueous extract of leaf and stem extract of *Santalum album*. *Ancient Science of Life* **25**, 6–9.
- Glass ADM, Britto DT, Kaiser BN, Kinghorn JR, Kronzucker HJ, Kumar A, Okamoto M, Rawat S, Siddiqi M, Unkles SE, et al.** 2002. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**, 855.
- Glevarec G, Bouton S, Jaspard E, Riou M-T, Cliquet J-B, Suzuki A, Limami AM.** 2004. Respective roles of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle and glutamate dehydrogenase in ammonium and amino acid metabolism during germination and post-germinative growth in the model legume *Medicago truncatula*. *Planta* **219**, 286–297.
- Godron DA.** 1857. *Flore de Lorraine*. J.-B. Baillière et fils.
- Gojon A, Krouk G, Perrine-Walker F, Laugier E.** 2011. Nitrate transceptor(s) in plants. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2299–2308.
- Gojon A, Nacry P, Davidian J-C.** 2009. Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 328–338.
- Gojon A, Plassard C, Bussi C.** 1994. Root/shoot distribution of NO₃⁻ assimilation in herbaceous and woody species. A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions, 131–147.
- Goldwasser Y, Kleifeld Y.** 2002. Tolerance of parsley varieties to *Orobancha*. *Crop Protection* **21**, 1101–1107.
- Goldwasser Y, Yoder JI.** 2001. Differential induction of *Orobancha* seed germination by *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* **160**, 951–959.
- Goldwasser Y, Yoneyama K, Xie X, Yoneyama K.** 2008. Production of Strigolactones by *Arabidopsis thaliana* responsible for *Orobancha aegyptiaca* seed germination. *Plant Growth Regulation* **55**, 21–28.
- Gombert J, Le Dily F, Lothier J, Etienne P, Rossato L, Allirand J-M, Jullien A, Savin A, Ourry A.** 2010. Effect of nitrogen fertilization on nitrogen dynamics in oilseed rape using ¹⁵N-labeling field experiment. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **173**, 875–884.

- Gombert J, Etienne P, Ourry A, Le Dily F.** 2006. The expression patterns of SAG12/Cab genes reveal the spatial and temporal progression of leaf senescence in *Brassica napus* L. with sensitivity to the environment. *Journal of experimental botany* **57**, 1949–1956.
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pages V, Dun EA, Pillot J-P, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais J-C, et al.** 2008. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**, 189–194.
- Gonsior G, Buschmann H, Szinicz G, Spring O, Sauerborn J.** 2004. Induced resistance-an innovative approach to manage branched broomrape (*Orobanche ramosa*) in hemp and tobacco. *Weed Science* **52**, 1050–1053.
- Gonzalez-Verdejo CI.** 2005. An Improved Axenic System for Studying Pre-infection Development of the Parasitic Plant *Orobanche ramosa*. *Annals of Botany* **96**, 1121–1127.
- Van der Graaff E.** 2006. Transcription Analysis of Arabidopsis Membrane Transporters and Hormone Pathways during Developmental and Induced Leaf Senescence. *PLANT PHYSIOLOGY* **141**, 776–792.
- Grant CA, Mahli SS, Karamanos RE.** 2012. Sulfur management for rapeseed. *Field Crops Research* **128**, 119–128.
- Gressel J.** 2009. Crops with target-site herbicide resistance for *Orobanche* and *Striga* control. *Pest Management Science* **65**, 560–565.
- Gressel J.** 2013. Biotechnologies for Directly Generating Crops Resistant to Parasites. In: Joel DM, Gressel J, Musselman LJ, eds. *Parasitic Orobanchaceae*. Springer Berlin Heidelberg, 433–458.
- Griffiths DW, Bradshaw JE, Taylor J, Gemmell DJ.** 1991. Effect of cultivar and harvest date on the glucosinolate and s-methylcysteine sulphoxide content of swedes (*Brassica napus* ssp *rapifera*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **56**, 539–549.
- Griffiths DW, Macfarlane-Smith WH, Boag B.** 1994. The effect of cultivar, sample date and grazing on the concentration of s-methylcysteine sulphoxide in oilseed and forage rapes (*Brassica napus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **64**, 283–288.
- Griffiths DW, Smith WHM.** 1989. Variation in S-methyl cysteine sulphoxide concentration with harvest date in forage rape (*Brassica napus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **47**, 249–252.
- Grignon N, Touraine B, Durand M.** 1989. 6 (5) Carboxyfluorescein as a tracer of phloem sap translocation. *American journal of botany*, 871–877.
- Guiboileau A, Sormani R, Meyer C, Masclaux-Daubresse C.** 2010. Senescence and death of plant organs: Nutrient recycling and developmental regulation. *Comptes Rendus Biologies* **333**, 382–391.
- Guignard J-L.** 2004. *Biochimie végétale*. Dunod.
- Guo F-Q.** 2002. The Nitrate Transporter AtNRT1.1 (CHL1) Functions in Stomatal Opening and Contributes to Drought Susceptibility in *Arabidopsis*. *THE PLANT CELL ONLINE* **15**, 107–117.

- Guo Y.** 2012. Towards systems biological understanding of leaf senescence. *Plant Molecular Biology*.
- Guo Y, Cai Z, Gan S.** 2004. Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant, Cell & Environment* **27**, 521–549.
- Guo F-Q, Wang R, Chen M, Crawford NM.** 2001. The *Arabidopsis* dual-affinity nitrate transporter gene AtNRT1. 1 (CHL1) is activated and functions in nascent organ development during vegetative and reproductive growth. *The Plant Cell Online* **13**, 1761–1777.
- Guri AZ, Patel KN.** 1998. Compositions and methods to prevent microbial contamination of plant tissue culture media.
- Gutiérrez RA, Stokes TL, Thum K, Xu X, Obertello M, Katari MS, Tanurdzic M, Dean A, Nero DC, McClung CR.** 2008. Systems approach identifies an organic nitrogen-responsive gene network that is regulated by the master clock control gene CCA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 4939–4944.
- Habashi C, Jeanmonod D.** 2008. Compléments au prodrome de la flore Corse : *Orobanchaceae*. Genève.
- Habekotté B.** 1993. Quantitative analysis of pod formation, seed set and seed filling in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) under field conditions. *Field Crops Research* **35**, 21–33.
- Hachiya T, Mizokami Y, Miyata K, Tholen D, Watanabe CK, Noguchi K.** 2010. Evidence for a nitrate-independent function of the nitrate sensor NRT1.1 in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research* **124**, 425–430.
- Hageman RH, Hucklesby DP.** 1971. [45] Nitrate reductase from higher plants. In: Anthony San Pietro, ed. *Methods in Enzymology*. Academic Press, 491–503.
- Haidar MA, Bibi W, Sidahmed MM.** 2003. Response of branched broomrape (*Orobanche ramosa*) growth and development to various soil amendments in potato. *Crop Protection* **22**, 291–294.
- Haidar MA, Sidahmed MM, Darwish R, Lafta A.** 2005. Selective control of *Orobanche ramosa* in potato with rimsulfuron and sub-lethal doses of glyphosate. *Crop Protection* **24**, 743–747.
- Hancock JT, Neill SJ, Wilson ID.** 2011. Nitric oxide and ABA in the control of plant function. *Plant Science* **181**, 555–559.
- Harb AM, Hameed KM, Shibli RA.** 2004. Effect of Triiodobenzoic Acid on Broomrape (*Orobanche ramosa*) Infection and Development in Tomato Plants. *The Plant Pathology Journal* **20**, 81–84.
- Harloff HJ, Wegmann K.** 1993. Evidence for a mannitol cycle in *Orobanche ramosa* and *Orobanche crenata*. *Journal of Plant Physiology* **141**, 513–520.
- Harmer SL.** 2000. Orchestrated Transcription of Key Pathways in *Arabidopsis* by the Circadian Clock. *Science* **290**, 2110–2113.
- Harvey BL, Downey RK.** 1964. The inheritance of erucic acid content in rapeseed (*Brassica napus*). *Canadian Journal of Plant Science* **44**, 104–111.

- Hassan MM, Sugmuto Y, Babiker AGE, Yamauchi Y, Osman MGE, Yagoud SO.** 2010. Effect of NaCl on *Orobanche* spp and *Striga hermonthica* seeds germination during and after conditioning. *Bioscience Research* **7**, 26–31.
- Hawksworth FG, Brian FGHDW, Wiens D.** 1996. Dwarf mistletoes. DIANE Publishing.
- Hayatsu M, Tago K, Saito M.** 2008. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition* **54**, 33–45.
- He Y, Tang W, Swain JD, Green AL, Jack TP, Gan S.** 2001. Networking senescence-regulating pathways by using Arabidopsis enhancer trap lines. *Plant Physiology* **126**, 707–716.
- Heidari B, Matre P, Nemie-Feyissa D, Meyer C, Rognli OA, Moller SG, Lillo C.** 2011. Protein Phosphatase 2A B55 and A Regulatory Subunits Interact with Nitrate Reductase and Are Essential for Nitrate Reductase Activation. *PLANT PHYSIOLOGY* **156**, 165–172.
- Herb R, Visser JH, Schildknecht H.** 1987. Recovery, isolation and preliminary structural investigation of germination stimulants produced by *Vigna unguiculata* Walp. cv. Saunders Upright. 351–366.
- Hermans C, Hammond JP, White PJ, Verbruggen N.** 2006. How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends in Plant Science* **11**, 610–617.
- Hesse H, Nikiforova V, Gakiere B, Hoefgen R.** 2004. Molecular analysis and control of cysteine biosynthesis: integration of nitrogen and sulphur metabolism. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1283–1292.
- Hibberd JM, Jeschke WD.** 2001. Solute flux into parasitic plants. *Journal of Experimental Botany* **52**, 2043–2049.
- Hibberd JM, Quick WP, Press MC, Scholes JD.** 1998. Can source–sink relations explain responses of tobacco to infection by the root holoparasitic angiosperm *Orobanche cernua*? *Plant, Cell & Environment* **21**, 333–340.
- Hibberd JM, Quick WP, Press MC, Scholes JD, Jeschke WD.** 1999. Solute fluxes from tobacco to the parasitic angiosperm *Orobanche cernua* and the influence of infection on host carbon and nitrogen relations. *Plant, Cell & Environment* **22**, 937–947.
- Hirai MY, Fujiwara T, Awazuhara M, Kimura T, Noji M, Saito K.** 2003. Global expression profiling of sulfur-starved *Arabidopsis* by DNA macroarray reveals the role of O-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *The Plant Journal* **33**, 651–663.
- Hirai MY, Yano M, Goodenowe DB, Kanaya S, Kimura T, Awazuhara M, Arita M, Fujiwara T, Saito K.** 2004. Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 10205.
- Hiraoka Y, Ueda H, Sugimoto Y.** 2009. Molecular responses of *Lotus japonicus* to parasitism by the compatible species *Orobanche aegyptiaca* and the incompatible species *Striga hermonthica*. *Journal of Experimental Botany* **60**, 641–650.

- Hirel B, McNally SF, Gadal P, Sumar N, Stewart GR.** 1984. Cytosolic glutamine synthetase in higher plants. *European Journal of Biochemistry* **138**, 63–66.
- Hirner A.** 2006. *Arabidopsis* LHT1 Is a High-Affinity Transporter for Cellular Amino Acid Uptake in Both Root Epidermis and Leaf Mesophyll. *THE PLANT CELL ONLINE* **18**, 1931–1946.
- Ho C-H, Lin S-H, Hu H-C, Tsay Y-F.** 2009. CHL1 Functions as a Nitrate Sensor in Plants. *Cell* **138**, 1184–1194.
- Ho C-H, Tsay Y-F.** 2010. Nitrate, ammonium, and potassium sensing and signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 604–610.
- Ben-Hod G, Losner D, Joel DM, Mayer AM.** 1993. Pectin methylesterase in calli and germinating seeds of *Orobanche aegyptiaca*. *Phytochemistry* **32**, 1399–1402.
- Hodge A.** 2004. The Plastic Plant: Root Responses to Heterogeneous Supplies of Nutrients. *New Phytologist* **162**, 9–24.
- Hodges M.** 2002. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation. *Journal of Experimental Botany* **53**, 905–916.
- Hoffland E, BOOGAARD R, Nelemans J, Findenegg G.** 1992. Biosynthesis and root exudation of citric and malic acids in phosphate-starved rape plants. *New Phytologist* **122**, 675–680.
- Höglund A-S, Rödin J, Larsson E, Rask L.** 1992. Distribution of napin and cruciferin in developing rape seed embryos. *Plant physiology* **98**, 509–515.
- Holandre JJJ.** 1842. *Nouvelle Flore de la Moselle*. Metz, France: Verronnais.
- Holub J.** 1990. Some taxonomic and nomenclatural changes within *Orobanche* s.l. (*Orobanchaceae*). *Preslia* **62**, 193–198.
- Höniges A.** 2009. ökologische und physiologische studien über orobanche arten in natürlichen ökosystem.
- Hopkins RJ, van Dam NM, van Loon JJA.** 2009. Role of Glucosinolates in Insect-Plant Relationships and Multitrophic Interactions. *Annual Review of Entomology* **54**, 57–83.
- Horie H, Yamashita K.** 2006. Non-derivatized analysis of methiin and alliin in vegetables by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1132**, 337–339.
- Hou S, He H, Zhang W, Xie H, Zhang X.** 2009a. Determination of soil amino acids by high performance liquid chromatography-electro spray ionization-mass spectrometry derivatized with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. *Talanta* **80**, 440–447.
- Hou S, He H, Zhang W, Xie H, Zhang X.** 2009b. Determination of soil amino acids by high performance liquid chromatography-electro spray ionization-mass spectrometry derivatized with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. *Talanta* **80**, 440–447.
- Hu H-C, Wang Y-Y, Tsay Y-F.** 2009. AtCIPK8, a CBL-interacting protein kinase, regulates the low-affinity phase of the primary nitrate response. *The Plant Journal* **57**, 264–278.

- Hubberten H-M, Klie S, Caldana C, Degenkolbe T, Willmitzer L, Hoefgen R.** 2012. Additional role of O-acetylserine as a sulfur status-independent regulator during plant growth: Regulatory role of O-acetylserine. *The Plant Journal* **70**, 666–677.
- Humphrey AJ, Beale MH.** 2006. Strigol: Biogenesis and physiological activity. *Phytochemistry* **67**, 636–640.
- Hunter JJ, Visser JH.** 1986a. The nitrate reductase activity (NRA) of some South African parasitic flowering plants and their hosts. *S. Afr. J. Bot* **52**, 81–84.
- Hunter JJ, Visser JH.** 1986b. Nitrate reductase activity (NRA) of cultivated *Scrophulariacean* root parasites. *S Afr J Bot* **52**, 246–248.
- Hurth MA.** 2005. Impaired pH Homeostasis in *Arabidopsis* Lacking the Vacuolar Dicarboxylate Transporter and Analysis of Carboxylic Acid Transport across the Tonoplast. *PLANT PHYSIOLOGY* **137**, 901–910.
- Imsande J, Touraine B.** 1994. N demand and the regulation of nitrate uptake. *Plant Physiology* **105**, 3.
- Inselsbacher E, Hinko-Najera Umana N, Stange FC, Gorfer M, Schüller E, Ripka K, Zechmeister-Boltenstern S, Hood-Novotny R, Strauss J, Wanek W.** 2010. Short-term competition between crop plants and soil microbes for inorganic N fertilizer. *Soil Biology and Biochemistry* **42**, 360–372.
- Irish VF.** 2010. The flowering of *Arabidopsis* flower development. *The Plant Journal* **61**, 1014–1028.
- Abu-Irmaileh BE, Abu-Rayyan AM.** 2006. Pre-Plant Black Plastic Mulching and Manure Composting for Controlling Hemp Broomrape (*Orobancha ramosa*) in Tomato. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* **2**.
- Irving LJ, Cameron DD.** 2009. You are What You Eat:: Interactions Between Root Parasitic Plants and Their Hosts. *Advances in Botanical Research* **50**, 87–138.
- Ishida H, Yoshimoto K.** 2008. Chloroplasts are partially mobilized to the vacuole by autophagy. *Autophagy* **4**, 961–962.
- Jaitz L, Mueller B, Koellensperger G, Huber D, Oburger E, Puschenreiter M, Hann S.** 2010. LC–MS analysis of low molecular weight organic acids derived from root exudation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **400**, 2587–2596.
- Jamison DS, Yoder JI.** 2001. Heritable variation in quinone-induced haustorium development in the parasitic plant *Triphysaria*. *Plant Physiology* **125**, 1870–1879.
- Jander G, Joshi V.** 2009. Recent Progress in Deciphering the Biosynthesis of Aspartate-Derived Amino Acids in Plants. *Molecular Plant* **3**, 54–65.
- Janssen BJ, Snowden KC.** 2012. Strigolactone and karrikin signal perception: receptors, enzymes, or both? *Frontiers in Plant Science* **3**.
- Janzen HH, Bettany JR.** 1984. Sulfur Nutrition of Rapeseed: I. Influence of Fertilizer Nitrogen and Sulfur Rates. *Soil Science Society of America Journal* **48**, 100–107.

- Jeschke WD, Baig A, Hilpert A.** 1997. Sink-stimulated photosynthesis, increased transpiration and increased demand-dependent stimulation of nitrate uptake: nitrogen and carbon relations in the parasitic association *Cuscuta reflexa-Coleus blumei*. *Journal of experimental botany* **48**, 915–925.
- Joel DM.** 2009. The new nomenclature of *Orobanche* and *Phelipanche*. *Weed Research* **49**, 6–7.
- Joel DM.** 2013. Functional Structure of the Mature Haustorium. In: Joel DM, Gressel J, Musselman LJ, eds. *Parasitic Orobanchaceae*. Springer Berlin Heidelberg, 25–60.
- Joel DM, Bar H, Mayer AM, Plakhine D, Ziadne H, Westwood JH, Welbaum GE.** 2011a. Seed ultrastructure and water absorption pathway of the root-parasitic plant *Phelipanche aegyptiaca* (*Orobanchaceae*). *Annals of Botany* **109**, 181–195.
- Joel DM, Chaudhuri SK, Plakhine D, Ziadna H, Steffens JC.** 2011b. Dehydrocostus lactone is exuded from sunflower roots and stimulates germination of the root parasite *Orobanche cumana*. *Phytochemistry* **72**, 624–634.
- Joel DM, Hershenhorn J, Eizenberg H, Aly R, Ejeta G, Rich PJ, Ransom JK, Sauerborn J, Rubiales D.** 2007. Biology and Management of Weedy Root Parasites. *Horticultural Reviews*. John Wiley & Sons, Inc., 267–349.
- Joel D, Kleifeld Y, Losner-Goshen D, Herzlinger G, Gressel J.** 1995. Transgenic crops against parasites. *Nature* March 16, 1995 **374**, 220–221.
- Joel DM, Losner-Goshen D.** 1994. The attachment organ of the parasitic angiosperms *Orobanche cumana* and *O. aegyptiaca* and its development. *Canadian Journal of Botany* **72**, 564–574.
- Joel DM, Losner-Goshen D, Goldman-Guez T, Portnoy VH.** 1998. The haustorium of *Orobanche*. *Proc. 4 th Int. Workshop on Orobanche* (Albena, Bulgaria).101–106.
- Johnson AW, Rosebery G, Parker C.** 1976. A novel approach to *Striga* and *Orobanche* control using synthetic germination stimulants. *Weed Research* **16**, 223–227.
- Jolivet E.** 1969. Physiologie de la tuberisation. *Annls Physiol. veg* **11**, 265–301.
- Jonassen EM, Lea US, Lillo C.** 2007. HY5 and HYH are positive regulators of nitrate reductase in seedlings and rosette stage plants. *Planta* **227**, 559–564.
- Jones MG.** 2004. Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1903–1918.
- Jones DL, Healey JR, Willett VB, Farrar JF, Hodge A.** 2005. Dissolved organic nitrogen uptake by plants—an important N uptake pathway? *Soil Biology and Biochemistry* **37**, 413–423.
- Jones DL, Owen AG, Farrar JF.** 2002. Simple method to enable the high resolution determination of total free amino acids in soil solutions and soil extracts. *Soil Biology and Biochemistry* **34**, 1893–1902.
- Jubault M, Hamon C, Gravot A, Lariagon C, Delourme R, Bouchereau A, Manzanares-Dauleux MJ.** 2008. Differential Regulation of Root Arginine Catabolism and Polyamine Metabolism in Clubroot-Susceptible and Partially Resistant Arabidopsis Genotypes. *PLANT PHYSIOLOGY* **146**, 2008–2019.

- Jung L.** 1992. Bien repérer les stades du colza. *Oléoscope* **7**, 18–19.
- Jupp P, Warren P, Secomb N.** 2002. The branched broomrape eradication program: methodologies, problems encountered and lessons learnt. Proceedings of the 13th Australian Weeds Conference. 270–273.
- Jurado-Expósito, Castejón-Muñoz, García-Torres.** 1999. Uptake and translocation of imazethapyr in peas as affected by parasitism of *Orobanche crenata* and herbicide application methods. *Weed Research* **39**, 129–136.
- Kaiser WM, Huber SC.** 2001. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1981–1989.
- Kaspar H, Dettmer K, Gronwald W, Oefner PJ.** 2008. Advances in amino acid analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **393**, 445–452.
- Kaup MT.** 2002. A Role for Diacylglycerol Acyltransferase during Leaf Senescence. *PLANT PHYSIOLOGY* **129**, 1616–1626.
- Kaur G, Chandna R, Pandey R, Abrol YP, Iqbal M, Ahmad A.** 2010. Sulfur starvation and restoration affect nitrate uptake and assimilation in rapeseed. *Protoplasma* **248**, 299–311.
- Kawachi N, Fujimaki S, Sakamoto K, Ishioka NS, Matsushashi S, Sekimoto H.** 2008. Analysis of NO₃ interception of the parasitic angiosperm *Orobanche* spp. using a positron-emitting tracer imaging system and ¹³NO₃⁻: A new method for the visualization and quantitative analysis of the NO₃ interception ratio. *Soil Science & Plant Nutrition* **54**, 408–416.
- Kebreab E, Murdoch AJ.** 1999a. Modelling the effects of water stress and temperature on germination rate of *Orobanche aegyptiaca* seeds. *Journal of Experimental Botany* **50**, 655–664.
- Kebreab E, Murdoch AJ.** 1999b. A quantitative model for loss of primary dormancy and induction of secondary dormancy in imbibed seeds of *Orobanche* spp. *Journal of Experimental Botany* **50**, 211–219.
- Keyes WJ, O'Malley RC, Kim D, Lynn DG.** 2000. Signaling organogenesis in parasitic angiosperms: xenognosin generation, perception, and response. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**, 217–231.
- Keyes WJ, Taylor JV, Apkarian RP, Lynn DG.** 2001. Dancing together. Social controls in parasitic plant development. *Plant physiology* **127**, 1508.
- Khan ZR, Pickett JA, Hassanali A, Hooper AM, Midega C a O.** 2008. *Desmodium* species and associated biochemical traits for controlling *Striga* species: present and future prospects. *Weed Research* **48**, 302–306.
- Khanna-Chopra R.** 2011. Leaf senescence and abiotic stresses share reactive oxygen species-mediated chloroplast degradation. *Protoplasma* **249**, 469–481.
- Kiba T, Kudo T, Kojima M, Sakakibara H.** 2010. Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1399–1409.

- Kichey T, Le Gouis J, Sangwan B, Hirel B, Dubois F.** 2005. Changes in the Cellular and Subcellular Localization of Glutamine Synthetase and Glutamate Dehydrogenase During Flag Leaf Senescence in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant and Cell Physiology* **46**, 964–974.
- Kiddle GA, Bennett RN, Hick AJ, Wallsgrave RM.** 1999. C-S lyase activities in leaves of crucifers and non-crucifers, and the characterization of three classes of C-S lyase activities from oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant, Cell & Environment* **22**, 433–445.
- Kim H, Hirai MY, Hayashi H, Chino M, Naito S, Fujiwara T.** 1999. Role of O-acetyl-L-serine in the coordinated regulation of the expression of a soybean seed storage-protein gene by sulfur and nitrogen nutrition. *Planta* **209**, 282–289.
- Kim TH, Kim EC, Kim SW, Lee HS, Choi D-W.** 2009. Exogenous Glutamate Inhibits the Root Growth and Increases the Glutamine Content in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Biology* **53**, 45–51.
- Kim D, Kocz R, Boone L, John Keyes W, Lynn DG.** 1998. On becoming a parasite: evaluating the role of wall oxidases in parasitic plant development. *Chemistry & biology* **5**, 103–117.
- King RW, Zeevaart JAD.** 1974. Enhancement of phloem exudation from cut petioles by chelating agents. *Plant Physiology* **53**, 96.
- Kirkegaard JA, Mele PM, Howe GN.** 1999. Enhanced accumulation of mineral-N following canola. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **39**, 587–593.
- Kirkegaard JA, Sarwar M.** 1998. Biofumigation potential of brassicas. *Plant and Soil* **201**, 71–89.
- Klein O, Kroschel J.** 2002. Biological control of *Orobancha* spp. with *Phytomyza orobanchia*, a review. *Biocontrol* **47**, 245–277.
- Knill T, Schuster J, Reichelt M, Gershenzon J, Binder S.** 2008. *Arabidopsis* Branched-Chain Aminotransferase 3 Functions in Both Amino Acid and Glucosinolate Biosynthesis. *PLANT PHYSIOLOGY* **146**, 1028–1039.
- Kohli A, Narciso JO, Miro B, Raorane M.** 2012. Root proteases: reinforced links between nitrogen uptake and mobilization and drought tolerance. *Physiologia Plantarum* **145**, 165–179.
- Kohlschmid E, Sauerborn J, Müller-Stöver D.** 2009. Impact of *Fusarium oxysporum* on the holoparasitic weed *Phelipanche ramosa*: biocontrol efficacy under field-grown conditions. *Weed Research* **49**, 56–65.
- Kole C, Thormann CE, Karlsson BH, Palta JP, Gaffney P, Yandell B, Osborn TC.** 2002. Comparative mapping of loci controlling winter survival and related traits in oilseed *Brassica rapa* and *B. napus*. *Molecular Breeding* **9**, 201–210.
- Koltai H.** 2011. Strigolactones are regulators of root development. *New Phytologist* **190**, 545–549.
- Koltai H, LekKala SP, Bhattacharya C, Mayzlish-Gati E, Resnick N, Wininger S, Dor E, Yoneyama K, Yoneyama K, Hershenhorn J, et al.** 2010. A tomato strigolactone-impaired mutant displays aberrant shoot morphology and plant interactions. *Journal of Experimental Botany* **61**, 1739–1749.

- Komarova NY, Thor K, Gubler A, Meier S, Dietrich D, Weichert A, Suter Grotemeyer M, Tegeder M, Rentsch D.** 2008. AtPTR1 and AtPTR5 Transport Dipeptides in Planta. *PLANT PHYSIOLOGY* **148**, 856–869.
- Konishi M, Yanagisawa S.** 2011. The Regulatory Region Controlling the Nitrate-Responsive Expression of a Nitrate Reductase Gene, NIA1, in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **52**, 824–836.
- Konishi M, Yanagisawa S.** 2013. *Arabidopsis* NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signalling. *Nature Communications* **4**, 1617.
- Kopriva S, Rennenberg H.** 2004. Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with N and C metabolism. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1831–1842.
- Koprivova A, Suter M, den Camp RO, Brunold C, Kopriva S.** 2000. Regulation of sulfate assimilation by nitrogen in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **122**, 737–746.
- Kötting O, Kossmann J, Zeeman SC, Lloyd JR.** 2010. Regulation of starch metabolism: the age of enlightenment? *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 320–328.
- Kotur Z, Mackenzie N, Ramesh S, Tyerman SD, Kaiser BN, Glass ADM.** 2012. Nitrate transport capacity of the *Arabidopsis thaliana* NRT2 family members and their interactions with AtNAR2.1. *New Phytologist* **194**, 724–731.
- Kretschmar T, Kohlen W, Sasse J, Borghi L, Schlegel M, Bachelier JB, Reinhardt D, Bours R, Bouwmeester HJ, Martinoia E.** 2012. A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nature* **483**, 341–344.
- Kronzucker HJ, Britto DT, Davenport RJ, Tester M.** 2001. Ammonium toxicity and the real cost of transport. *Trends in Plant Science* **6**, 335–337.
- Kronzucker HJ, Glass ADM, Siddiqi MY.** 1999. Inhibition of Nitrate Uptake by Ammonium in Barley. Analysis of Component Fluxes. *Plant Physiology* **120**, 283–292.
- Krouk G, Crawford NM, Coruzzi GM, Tsay Y-F.** 2010a. Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 265–272.
- Krouk G, Lacombe B, Bielach A, Perrine-Walker F, Malinska K, Mounier E, Hoyerova K, Tillard P, Leon S, Ljung K.** 2010b. Nitrate-Regulated Auxin Transport by NRT1.1 Defines a Mechanism for Nutrient Sensing in Plants. *Developmental Cell* **18**, 927–937.
- Krouk G, Tillard P, Gojon A.** 2006. Regulation of the High-Affinity NO₃⁻ Uptake System by NRT1.1-Mediated NO₃⁻ Demand Signaling in *Arabidopsis*. *PLANT PHYSIOLOGY* **142**, 1075–1086.
- 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.
- Kubec R, Svobodova M, Velsek J.** 2001. Gas-chromatographic determination of S -methylcysteine sulfoxide in cruciferous vegetables. *European Food Research and Technology* **213**, 386–388.

- Kuijt J.** 1977. Haustoria of phanerogamic parasites. Annual review of phytopathology **15**, 91–118.
- Kumada Y, Benson DR, Hillemann D, Hosted TJ, Rochefort DA, Thompson CJ, Wohlleben W, Tateno Y.** 1993. Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes. Proceedings of the National Academy of Sciences **90**, 3009–3013.
- Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y.** 2008. Polyamines: essential factors for growth and survival. Planta **228**, 367–381.
- Kusumoto D, Goldwasser Y, Xie X, Yoneyama K, Takeuchi Y, Yoneyama K.** 2007. Resistance of red clover (*Trifolium pratense*) to the root parasitic plant *Orobancha minor* is activated by salicylate but not by jasmonate. Annals of botany **100**, 537–544.
- Kutz A, Müller A, Hennig P, Kaiser WM, Piotrowski M, Weiler EW.** 2002. A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulphur-starving *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal **30**, 95–106.
- Labrousse P, Arnaud MC, Griveau Y, Fer A, Thalouarn P.** 2004. Analysis of resistance criteria of sunflower recombined inbred lines against *Orobancha cumana* Wallr. Crop Protection **23**, 407–413.
- Labrousse P, Arnaud MC, Serieys H, Bervillé A, Thalouarn P.** 2001. Several mechanisms are involved in resistance of Helianthus to *Orobancha cumana* Wallr. Annals of Botany **88**, 859.
- Labrousse P, Delmail D, Arnaud MC, Thalouarn P.** 2010. Mineral nutrient concentration influences sunflower infection by broomrape (*Orobancha cumana*). Botany **88**, 839–849.
- Lainé P, Ourry A, Macduff J, Boucaud J, Salette J.** 1993. Kinetic parameters of nitrate uptake by different catch crop species: effects of low temperatures or previous nitrate starvation. Physiologia Plantarum **88**, 85–92.
- Lalonde S, Tegeder M, Throne-Holst M, Frommer WB, Patrick JW.** 2003. Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. Plant, Cell & Environment **26**, 37–56.
- Lambeck IC, Fischer-Schrader K, Niks D, Roeper J, Chi J-C, Hille R, Schwarz G.** 2011. Molecular Mechanism of 14-3-3 Protein-mediated Inhibition of Plant Nitrate Reductase. Journal of Biological Chemistry **287**, 4562–4571.
- Lancaster JE, Shaw ML.** 1991. Metabolism of γ -glutamyl peptides during development, storage and sprouting of onion bulbs. Phytochemistry **30**, 2857–2859.
- Lancien M, Martin M, Hsieh M-H, Leustek T, Goodman H, Coruzzi GM.** 2002. *Arabidopsis* *glt1-T* mutant defines a role for NADH-GOGAT in the non-photorespiratory ammonium assimilatory pathway. The Plant Journal **29**, 347–358.
- Lanquar V, Loque D, Hormann F, Yuan L, Bohner A, Engelsberger WR, Lalonde S, Schulze WX, von Wiren N, Frommer WB.** 2009. Feedback Inhibition of Ammonium Uptake by a Phospho-Dependent Allosteric Mechanism in *Arabidopsis*. The Plant Cell **21**, 3610–3622.
- Lappartient AG, Vidmar JJ, Leustek T, Glass ADM, Touraine B.** 1999. Inter-organ signaling in plants: regulation of ATP sulfurylase and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound. The Plant Journal **18**, 89–95.

- Laugier E, Bouguyon E, Mauries A, Tillard P, Gojon A, Lejay L.** 2011. Regulation of High-Affinity Nitrate Uptake in Roots of *Arabidopsis* Depends Predominantly on Posttranscriptional Control of the NRT2.1/NAR2.1 Transport System. *PLANT PHYSIOLOGY* **158**, 1067–1078.
- Lavenus J, Goh T, Roberts I, Guyomarc'h S, Lucas M, De Smet I, Fukaki H, Beeckman T, Bennett M, Laplaze L.** 2013. Lateral root development in *Arabidopsis*: fifty shades of auxin. *Trends in Plant Science*.
- Lavergne G-G.** 1893. Contribution à l'histoire des orobanches, étude des espèces vivant sur les plantes cultivées, traitements et procédés culturaux usités contre ces parasites. Montpellier.
- Lazof DB, Rufty TW, Redinbaugh MG.** 1992. Localization of nitrate absorption and translocation within morphological regions of the corn root. *Plant Physiology* **100**, 1251–1258.
- Lea P, Azevedo R.** 2007. Nitrogen use efficiency. 2. Amino acid metabolism. *Annals of Applied Biology* **151**, 269–275.
- Lea US, Leydecker M-T, Quillere I, Meyer C, Lillo C.** 2006. Posttranslational Regulation of Nitrate Reductase Strongly Affects the Levels of Free Amino Acids and Nitrate, whereas Transcriptional Regulation Has Only Minor Influence. *PLANT PHYSIOLOGY* **140**, 1085–1094.
- Lea PJ, Sodek L, Parry MAJ, Shewry PR, Halford NG.** 2007. Asparagine in plants. *Annals of Applied Biology* **150**, 1–26.
- Leblanc A, Segura R, Deleu C, Le Deunff E.** 2013. In low transpiring conditions, uncoupling the BnNrt2.1 and BnNrt1.1 NO₃⁻ transporters by glutamate treatment reveals the essential role of BnNRT2.1 for nitrate uptake and the nitrate-signaling cascade during growth. *Plant Signaling & Behavior* **8**, e22904.
- Lechat M-M, Pouvreau J-B, Peron T, Gauthier M, Montiel G, Veronesi C, Todoroki Y, Le Bizec B, Monteau F, Macherel D, et al.** 2012. PrCYP707A1, an ABA catabolic gene, is a key component of *Phelipanche ramosa* seed germination in response to the strigolactone analogue GR24. *Journal of Experimental Botany* **63**, 5311–5322.
- Lee Y-H, Foster J, Chen J, Voll LM, Weber APM, Tegeder M.** 2007. AAP1 transports uncharged amino acids into roots of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **50**, 305–319.
- Lee J, Lee I.** 2010. Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator. *Journal of Experimental Botany* **61**, 2247–2254.
- Lee BR, Muneer S, Kim KY, Avice JC, Ourry A, Kim TH.** 2012. S-deficiency responsive accumulation of amino acids is mainly due to hydrolysis of the previously synthesized proteins—not to de novo synthesis in *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum*.
- Lee RB, Purves JV, Ratcliffe RG, Saker LR.** 1992. Nitrogen Assimilation and the Control of Ammonium and Nitrate Absorption by Maize Roots. *Journal of Experimental Botany* **43**, 1385–1396.
- Lehmann S, Gummy C, Blatter E, Boeffel S, Fricke W, Rentsch D.** 2010. In planta function of compatible solute transporters of the AtProT family. *Journal of Experimental Botany* **62**, 787–796.

- Lejay L, Gansel X, Cerezo M, Tillard P, Müller C, Krapp A, Von Wirén N, Daniel-Vedele F, Gojon A.** 2003. Regulation of Root Ion Transporters by Photosynthesis: Functional Importance and Relation with Hexokinase. *THE PLANT CELL ONLINE* **15**, 2218–2232.
- Lejay L, Tillard P, Lepetit M, Olive FD, Filleur S, Daniel-Vedele F, Gojon A.** 1999. Molecular and functional regulation of two NO_3^- uptake systems by N-and C-status of *Arabidopsis* plants. *The Plant Journal* **18**, 509–519.
- Lejay L, Wirth J, Pervent M, Cross JM-F, Tillard P, Gojon A.** 2008. Oxidative Pentose Phosphate Pathway-Dependent Sugar Sensing as a Mechanism for Regulation of Root Ion Transporters by Photosynthesis. *PLANT PHYSIOLOGY* **146**, 2036–2053.
- Leleu O.** 2004. Unusual regulatory nitrate reductase activity in cotyledons of *Brassica napus* seedlings: enhancement of nitrate reductase activity by ammonium supply. *Journal of Experimental Botany* **55**, 815–823.
- Leleu O, Vuylstecker C, Tetu JF, Degrande D, Champolivier L, Rambour S.** 2000. Effect of two contrasted N fertilisations on rapeseed growth and nitrate metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**, 639–645.
- Le Ny F, Leblanc A, Beauclair P, Deleu C, Le Deunff E.** 2013. In low transpiring conditions, nitrate and water fluxes for growth of *B. napus* plantlets correlate with changes in BnNrt2.1 and BnNrt1.1 nitrate transporter expression. *Plant Signaling & Behavior* **8**, e22902.
- Leterme P.** 1988. Croissance et développement du colza d' hiver : les principales étapes.
- Letousey P, De Zélicourt A, Vieira Dos Santos C, Thoiron S, Monteau F, Simier P, Thalouarn P, Delavault P.** 2007. Molecular analysis of resistance mechanisms to *Orobanche cumana* in sunflower. *Plant Pathology* **56**, 536–546.
- Lewandowska M, Sirko A.** 2008. Recent advances in understanding plant response to sulfur-deficiency stress. *Acta Biochimica Polonica* **55**, 457–471.
- Li J-Y, Fu Y-L, Pike SM, Bao J, Tian W, Zhang Y, Chen C-Z, Zhang Y, Li H-M, Huang J, et al.** 2010. The *Arabidopsis* Nitrate Transporter NRT1.8 Functions in Nitrate Removal from the Xylem Sap and Mediates Cadmium Tolerance. *THE PLANT CELL ONLINE* **22**, 1633–1646.
- Li R-J, Hua W, Lu Y-T.** 2006. *Arabidopsis* cytosolic glutamine synthetase AtGLN1;1 is a potential substrate of AtCRK3 involved in leaf senescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **342**, 119–126.
- Li Z, Peng J, Wen X, Guo H.** 2012. Gene Network Analysis and Functional Studies of Senescence-associated Genes Reveal Novel Regulators of *Arabidopsis* Leaf Senescence. *Journal of Integrative Plant Biology* **54**, 526–539.
- Ligaba A, Shen H, Shibata K, Yamamoto Y, Tanakamaru S, Matsumoto H.** 2004. The role of phosphorus in aluminium-induced citrate and malate exudation from rape (*Brassica napus*). *Physiologia Plantarum* **120**, 575–584.
- Lillo C.** 2008. Signalling cascades integrating light-enhanced nitrate metabolism. *Biochemical Journal* **415**, 11.

- Lillo C, Meyer C, Lea US, Provan F, Oltedal S.** 2004. Mechanism and importance of post-translational regulation of nitrate reductase. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1275–1282.
- Lillo C, Meyer C, Ruoff P.** 2001. The nitrate reductase circadian system. The central clock dogma contra multiple oscillatory feedback loops. *Plant Physiology* **125**, 1554–1557.
- Lillo C, Ruoff P.** 1992. Hysteretic behavior of nitrate reductase. Evidence of an allosteric binding site for reduced pyridine nucleotides. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 13456–13459.
- Lim PO, Kim HJ, Gil Nam H.** 2007. Leaf Senescence. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 115–136.
- Lima JE, Kojima S, Takahashi H, von Wiren N.** 2010. Ammonium Triggers Lateral Root Branching in *Arabidopsis* in an AMMONIUM TRANSPORTER1;3-Dependent Manner. *THE PLANT CELL ONLINE* **22**, 3621–3633.
- Lima L, Seabra A, Melo P, Cullimore J, Carvalho H.** 2005. Phosphorylation and subsequent interaction with 14-3-3 proteins regulate plastid glutamine synthetase in *Medicago truncatula*. *Planta* **223**, 558–567.
- Limami AM, Glevarec G, Ricoult C, Cliquet J-B, Planchet E.** 2008. Concerted modulation of alanine and glutamate metabolism in young *Medicago truncatula* seedlings under hypoxic stress. *Journal of Experimental Botany* **59**, 2325–2335.
- Lin S-H, Kuo H-F, Canivenc G, Lin C-S, Lepetit M, Hsu P-K, Tillard P, Lin H-L, Wang Y-Y, Tsai C-B, et al.** 2008. Mutation of the *Arabidopsis* NRT1.5 Nitrate Transporter Causes Defective Root-to-Shoot Nitrate Transport. *THE PLANT CELL ONLINE* **20**, 2514–2528.
- Linke K-H, Sauerborn J, Saxena MC.** 1989. *Orobanche* field guide. University of Hohenheim.
- Little DY, Rao H, Oliva S, Daniel-Vedele F, Krapp A, Malamy JE.** 2005. The putative high-affinity nitrate transporter NRT2. 1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 13693–13698.
- Liu L-H, Ludewig U, Frommer WB, von Wirén N.** 2003. AtDUR3 Encodes a New Type of High-Affinity Urea/H⁺ Symporter in *Arabidopsis*. *THE PLANT CELL ONLINE* **15**, 790–800.
- Liu X, Bush DR.** 2006. Expression and transcriptional regulation of amino acid transporters in plants. *Amino Acids* **30**, 113–120.
- Liu T-Y, Chang C-Y, Chiou T-J.** 2009. The long-distance signaling of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 312–319.
- Liu J, Wu YH, Yang JJ, Liu YD, Shen FF.** 2008. Protein degradation and nitrogen remobilization during leaf senescence. *Journal of Plant Biology* **51**, 11–19.
- Lloyd JR, Kossmann J, Ritte G.** 2005. Leaf starch degradation comes out of the shadows. *Trends in Plant Science* **10**, 130–137.
- Lohaus G, Moellers C.** 2000. Phloem transport of amino acids in two *Brassica napus* L. genotypes and one *B. carinata* genotype in relation to their seed protein content. *Planta* **211**, 833–840.

- Long S, Lenzemo V, Kuyper TW, Kang Z, Vierheilig H, Steinkellner S.** 2008. A simple staining method for observation of germinated *Striga* seeds. *Seed Science Research* **18**.
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L.** 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 280–287.
- López-Ráez JA, Matusova R, Cardoso C, Jamil M, Charnikhova T, Kohlen W, Ruyter-Spira C, Verstappen F, Bouwmeester H.** 2009. Strigolactones: ecological significance and use as a target for parasitic plant control. *Pest Management Science* **65**, 471–477.
- Loqué D.** 2003. Gene Expression of the NO₃⁻ Transporter NRT1.1 and the Nitrate Reductase NIA1 Is Repressed in *Arabidopsis* Roots by NO₂⁻, the Product of NO₃⁻ Reduction. *PLANT PHYSIOLOGY* **132**, 958–967.
- Loqué D, Lalonde S, Looger LL, von Wirén N, Frommer WB.** 2007. A cytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake. *Nature* **446**, 195–198.
- Loqué D, Yuan L, Kojima S, Gojon A, Wirth J, Gazzarrini S, Ishiyama K, Takahashi H, von Wirén N.** 2006. Additive contribution of AMT1.1 and AMT1.3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal* **48**, 522–534.
- Losner-Goshen D, Portnoy V, Mayer AM, Joel DM.** 1998. Pectolytic Activity by the Haustorium of the Parasitic Plant *Orobancha* L.(*Orobanchaceae*) in Host Roots. *Annals of Botany* **81**, 319–326.
- Lothier J, Gaufichon L, Sormani R, Lemaitre T, Azzopardi M, Morin H, Chardon F, Reisdorf-Cren M, Avice J-C, Masclaux-Daubresse C.** 2011. The cytosolic glutamine synthetase GLN1;2 plays a role in the control of plant growth and ammonium homeostasis in *Arabidopsis* rosettes when nitrate supply is not limiting. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1375–1390.
- Louarn J, Carbonne F, Delavault P, Bécard G, Rochange S.** 2012. Reduced Germination of *Orobancha cumana* Seeds in the Presence of Arbuscular Mycorrhizal Fungi or Their Exudates (EJ van Damme, Ed.). *PLoS ONE* **7**, e49273.
- Loudet O, Saliba-Colombani V, Camilleri C, Calenge F, Gaudon V, Koprivova A, North KA, Kopriva S, Daniel-Vedele F.** 2007. Natural variation for sulfate content in *Arabidopsis thaliana* is highly controlled by APR2. *Nature Genetics* **39**, 896–900.
- Lozano-Baena MD, Prats E, Moreno MT, Rubiales D, Perez-de-Luque A.** 2007. *Medicago truncatula* as a Model for Nonhost Resistance in Legume-Parasitic Plant Interactions. *PLANT PHYSIOLOGY* **145**, 437–449.
- Ludewig U.** 2006. Ion transport versus gas conduction: function of AMT/Rh-type proteins. *Transfusion Clinique et Biologique* **13**, 111–116.
- Ludewig U, Neuhäuser B, Dynowski M.** 2007. Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. *FEBS Letters* **581**, 2301–2308.
- Ludwig-Müller J.** 2008. Glucosinolates and the clubroot disease: defense compounds or auxin precursors? *Phytochemistry Reviews* **8**, 135–148.

- Lugan R, Nioget M-F, Kervazo L, Larher FR, Kopka J, Bouchereau A.** 2009. Metabolome and water status phenotyping of *Arabidopsis* under abiotic stress cues reveals new insight into *ESK1* function. *Plant, Cell & Environment* **32**, 95–108.
- Luquez VMC.** 2006. Quantitative trait loci analysis of leaf and plant longevity in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1363–1372.
- Mabrouk Y, Mejri S, Hemissi I, Simier P, Delavault P, Saidi M, Belhadj O.** 2010. Bioprotection mechanisms of pea plant by *Rhizobium leguminosarum* against *Orobanche crenata*. *African Journal of Microbiology Research* **4**, 2570–2575.
- Mabrouk Y, Simier P, Arfaoui A, Sifi B, Delavault P, Zourgui L, Belhadj O.** 2007a. Induction of Phenolic Compounds in Pea (*Pisum sativum* L.) Inoculated by *Rhizobium leguminosarum* and Infected with *Orobanche crenata*. *Journal of Phytopathology* **155**, 728–734.
- Mabrouk Y, Simier P, Delavault P, Delgrange S, Sifi B, Zourgui L, Belhadj O.** 2007b. Molecular and biochemical mechanisms of defence induced in pea by *Rhizobium leguminosarum* against *Orobanche crenata*. *Weed Research* **47**, 452–460.
- Macduff JH, Jackson SB.** 1992. Influx and Efflux of Nitrate and Ammonium in Italian Ryegrass and White Clover Roots: Comparisons Between Effects of Darkness and Defoliation. *Journal of Experimental Botany* **43**, 525–535.
- Mackintosh C.** 1992. Regulation of spinach-leaf nitrate reductase by reversible phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1137**, 121–126.
- Maeda H, Dudareva N.** 2012. The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **63**, 73–105.
- Magnus V, Simaga S, Iskrić S, Kveder S.** 1982. Metabolism of tryptophan, indole-3-acetic acid, and related compounds in parasitic plants from the genus *Orobanche*. *Plant Physiology* **69**, 853–858.
- Malagoli P, Lainé P, Le Deunff E, Rossato L, Ney B, Ourry A.** 2004. Modeling Nitrogen Uptake in Oilseed Rape cv Capitol during a Growth Cycle Using Influx Kinetics of Root Nitrate Transport Systems and Field Experimental Data. *PLANT PHYSIOLOGY* **134**, 388–400.
- Malagoli P, Laine P, Rossato L, Ourry A.** 2005. Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to harvest. *Annals of Botany* **95**, 853.
- Manen J-F, Habashi C, Jeanmonod D, Park J-M, Schneeweiss GM.** 2004. Phylogeny and intraspecific variability of holoparasitic *Orobanche* (*Orobanchaceae*) inferred from plastid rbcL sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **33**, 482–500.
- Mangnus EM, Dommerholt FJ, De Jong RLP, Zwanenburg B.** 1992. Improved synthesis of strigol analog GR24 and evaluation of the biological activity of its diastereomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 1230–1235.
- Le Maout E, Decaisne J.** 1876. *Traité général de botanique descriptive et analytique*. Firmin-Didot et cie.

- Marks HS, Hilson JA, Leichtweis HC, Stoewsand GS.** 1992. S-methylcysteine sulfoxide in *Brassica* vegetables and formation of methyl methanethiosulfinate from Brussels sprouts. *Journal of agricultural and food chemistry* **40**, 2098–2101.
- Martin A, Lee J, Kichey T, Gerentes D, Zivy M, Tatout C, Dubois F, Balliau T, Valot B, Davanture M, et al.** 2006. Two Cytosolic Glutamine Synthetase Isoforms of Maize Are Specifically Involved in the Control of Grain Production. *THE PLANT CELL ONLINE* **18**, 3252–3274.
- Martinoia E, Heck U, Wiemken A.** 1981. Vacuoles as storage compartments for nitrate in barley leaves. *Nature* **289**, 292–294.
- Maruyama-Nakashita A.** 2003. Transcriptome Profiling of Sulfur-Responsive Genes in *Arabidopsis* Reveals Global Effects of Sulfur Nutrition on Multiple Metabolic Pathways. *PLANT PHYSIOLOGY* **132**, 597–605.
- Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Tohge T, Saito K, Takahashi H.** 2006. Arabidopsis SLIM1 Is a Central Transcriptional Regulator of Plant Sulfur Response and Metabolism. *THE PLANT CELL ONLINE* **18**, 3235–3251.
- Marzec M, Muszynska A, Gruszka D.** 2013. The Role of Strigolactones in Nutrient-Stress Responses in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 9286–9304.
- Masclaux-Daubresse C.** 2008. Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. *Plant Biology* **10**, 23–36.
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A.** 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* **105**, 1141–1157.
- Masclaux-Daubresse C, Purdy S, Lemaitre T, Pourtau N, Taconnat L, Renou J-P, Wingler A.** 2006a. Genetic Variation Suggests Interaction between Cold Acclimation and Metabolic Regulation of Leaf Senescence. *PLANT PHYSIOLOGY* **143**, 434–446.
- Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Pageau K, Lelandais M, Grandjean O, Kronenberger J, Valadier MH, Feraud M, Jouglet T, Suzuki A.** 2006b. Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. *Plant Physiology* **140**, 444–456.
- Matt P, Geiger M, Walch-Liu P, Engels C, Krapp A, Stitt M.** 2001. The immediate cause of the diurnal changes of nitrogen metabolism in leaves of nitrate-replete tobacco: a major imbalance between the rate of nitrate reduction and the rates of nitrate uptake and ammonium metabolism during the first part of the light period. *Plant, Cell & Environment* **24**, 177–190.
- Matusova R, Mourik T van, Bouwmeester HJ.** 2004. Changes in the sensitivity of parasitic weed seeds to germination stimulants. *Seed Science Research* **14**, 335–344.
- Matusova R, Rani K, Verstappen FW., Franssen MC., Beale MH, Bouwmeester HJ.** 2005. The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobancha* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiology* **139**, 920.
- Matvienko M, Wojtowicz A, Wrobel R, Jamison D, Goldwasser Y, Yoder JI.** 2001. Quinone oxidoreductase message levels are differentially regulated in parasitic and non-parasitic plants exposed to allelopathic quinones. *The Plant Journal* **25**, 375–387.

- Maurel C, Verdoucq L, Luu D-T, Santoni V.** 2008. Plant Aquaporins: Membrane Channels with Multiple Integrated Functions. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 595–624.
- Maurino VG, Peterhansel C.** 2010. Photorespiration: current status and approaches for metabolic engineering. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 248–255.
- McCully ME, Miller C, Sprague SJ, Huang CX, Kirkegaard JA.** 2008. Distribution of glucosinolates and sulphur-rich cells in roots of field-grown canola (*Brassica napus*). *New Phytologist* **180**, 193–205.
- McGregor DI.** 1988. Glucosinolate content of developing rapeseed (*Brassica napus* L.'Midas') seedlings. *Canadian Journal of Plant Science* **68**, 367–380.
- McNally SF, Hirel B, Gadal P, Mann AF, Stewart GR.** 1983. Glutamine synthetases of higher plants evidence for a specific isoform content related to their possible physiological role and their compartmentation within the leaf. *Plant physiology* **72**, 22–25.
- McNeal JR, Bennett JR, Wolfe AD, Mathews S.** 2013. Phylogeny and origins of holoparasitism in *Orobanchaceae*. *American Journal of Botany*.
- Meharg AA, Blatt MR.** 1995. NO₃⁻ transport across the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* root hairs: kinetic control by pH and membrane voltage. *The Journal of membrane biology* **145**, 49–66.
- Mejri S, Mabrouk Y, Voisin M, Delavault P, Simier P, Saidi M, Belhadj O.** 2012. Variation in quantitative characters of faba bean after seed irradiation and associated molecular changes. *African Journal of Biotechnology* **11**, 8383–8390.
- Mérigout P, Lelandais M, Bitton F, Renou J-P, Briand X, Meyer C, Daniel-Vedele F.** 2008. Physiological and Transcriptomic Aspects of Urea Uptake and Assimilation in *Arabidopsis* Plants. *PLANT PHYSIOLOGY* **147**, 1225–1238.
- Meyer C, Stitt M.** 2001. Nitrate Reduction and signalling. In: Lea PDPJ, Morot-Gaudry J-F, eds. *Plant Nitrogen*. Springer Berlin Heidelberg, 37–59.
- Mifflin BJ, Habash DZ.** 2002. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *Journal of Experimental Botany* **53**, 979–987.
- Migge A, Bork C, Hell R, Becker TW.** 2000. Negative regulation of nitrate reductase gene expression by glutamine or asparagine accumulating in leaves of sulfur-deprived tobacco. *Planta* **211**, 587–595.
- Miller AJ, Cramer MD.** 2005. Root nitrogen acquisition and assimilation. *Root Physiology: from Gene to Function*. Springer, 1–36.
- Miller AJ, Fan X, Orsel M, Smith SJ, Wells DM.** 2007a. Nitrate transport and signalling. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2297–2306.
- Miller AJ, Fan X, Shen Q, Smith SJ.** 2007b. Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. *Journal of Experimental Botany* **59**, 111–119.

- Mimmo T, Hann S, Jaitz L, Cesco S, Gessa CE, Puschenreiter M.** 2011. Time and substrate dependent exudation of carboxylates by *Lupinus albus* L. and *Brassica napus* L. *Plant Physiology and Biochemistry* **49**, 1272–1278.
- Minchin PEH, Lacoïnte A.** 2005. New understanding on phloem physiology and possible consequences for modelling long-distance carbon transport. *New Phytologist* **166**, 771–779.
- Mohamed, Ejeta, Butler, Housley.** 1998. Moisture content and dormancy in *Striga asiatica* seeds. *Weed Research* **38**, 257–265.
- Molero G, Aranjuelo I, Teixidor P, Araus JL, Nogués S.** 2011. Measurement of ¹³C and ¹⁵N isotope labeling by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry to study amino acid fluxes in a plant-microbe symbiotic association. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **25**, 599–607.
- Molinero-Ruiz ML, R G-R, J MM-V, J D.** 2009. *Orobanche cumana* race F: performance of resistant sunflower hybrids and aggressiveness of populations of the parasitic weed. *Weed Research* **49**, 469–478.
- Molnár-Perl I.** 2003. Quantitation of amino acids and amines in the same matrix by high-performance liquid chromatography, either simultaneously or separately. *Journal of Chromatography A* **987**, 291–309.
- Mor A, Mayer AM, Levine A.** 2008. Possible peroxidase functions in the interaction between the parasitic plant, *Orobanche aegyptiaca*, and its host, *Arabidopsis thaliana*. *Weed Biology and Management* **8**, 1–10.
- Morard M, Vaca-Garcia C, Stevens M, Van Acker J, Pignolet O, Borredon E.** 2007. Durability improvement of wood by treatment with Methyl Alkenoate Succinic Anhydrides (M-ASA) of vegetable origin. *International Biodeterioration & Biodegradation* **59**, 103–110.
- Moreau M, Lindermayr C, Durner J, Klessig DF.** 2010. NO synthesis and signaling in plants - where do we stand? *Physiologia Plantarum* **138**, 372–383.
- Morot-Gaudry JF, Orsel M, Diaz C, Daniel-Vedele F, Masclaux-Daubresse C.** 2006. Absorption et assimilation du nitrate et recyclage de l'azote organique chez les plantes: intérêt pour le colza. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* **13**, 393–402.
- Mosmann T.** 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**, 55–63.
- Mower JP, Stefanović S, Young GJ, Palmer JD.** 2004. Plant genetics: gene transfer from parasitic to host plants. *Nature* **432**, 165–166.
- Mower J, Stefanović S, Hao W, Gummow J, Jain K, Ahmed D, Palmer J.** 2010. Horizontal acquisition of multiple mitochondrial genes from a parasitic plant followed by gene conversion with host mitochondrial genes. *BMC biology* **8**, 150.
- Muller B, Tillard P, Touraine B.** 1995. Nitrate fluxes in soybean seedling roots and their response to amino acids: an approach using ¹⁵N. *Plant, Cell & Environment* **18**, 1267–1279.

- Munos S.** 2004. Transcript Profiling in the chl1-5 Mutant of *Arabidopsis* Reveals a Role of the Nitrate Transporter NRT1.1 in the Regulation of Another Nitrate Transporter, NRT2.1. *THE PLANT CELL ONLINE* **16**, 2433–2447.
- Musselman LJ.** 1980. The biology of *Striga*, *Orobanche*, and other root-parasitic weeds. *Annual Review of Phytopathology* **18**, 463–489.
- Musselman LJ.** 1986. Taxonomy of *Orobanche*. Proceedings of a workshop on biology and control of *Orobanche*, Wageningen (Netherlands), 13-17 Jan 1986. Landbouwniversiteit, .
- Musselman LJ, Parker C, Dixon N.** 1982. Notes on autogamy and flower structure in agronomically important species of *Striga* (*Scrophulariaceae*) and *Orobanche* (*Orobanchaceae*). *Beitr. Biol. Pfl* **56**, 329–43.
- Nandula VK, Foster JG, Foy CL.** 2000. Impact of Egyptian Broomrape (*Orobanche aegyptiaca* (Pers.) Parasitism on Amino Acid Composition of Carrot (*Daucus carota* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 3930–3934.
- Nandula VK, Westwood JH, Foster JG, Foy CL.** 2001. Influence of glyphosate on amino acid composition of Egyptian broomrape [*Orobanche aegyptiaca* (Pers.)] and selected hosts. *Journal of agricultural and food chemistry* **49**, 1524–1528.
- Näsholm T, Kielland K, Ganeteg U.** 2009. Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytologist* **182**, 31–48.
- Navarro C, Abelenda JA, Cruz-Oró E, Cuéllar CA, Tamaki S, Silva J, Shimamoto K, Prat S.** 2011. Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T. *Nature* **478**, 119–122.
- Nazoa P, Vidmar JJ, Tranbarger TJ, Mouline K, Damiani I, Tillard P, Zhuo D, Glass AD, Touraine B.** 2003. Regulation of the nitrate transporter gene AtNRT2. 1 in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. *Plant molecular biology* **52**, 689–703.
- Nefkens GH, Thuring JWJ, Beenackers MF, Zwanenburg B.** 1997. Synthesis of a phthaloylglycine-derived strigol analogue and its germination stimulatory activity toward seeds of the parasitic weeds *Striga hermonthica* and *Orobanche crenata*. *Journal of agricultural and food chemistry* **45**, 2273–2277.
- Nero D, Krouk G, Tranchina D, Coruzzi GM.** 2009. A system biology approach highlights a hormonal enhancer effect on regulation of genes in a nitrate responsive 'biomodule'. *BMC Systems Biology* **3**, 59.
- Nesi N, Delourme R, Brégeon M, Falentin C, Renard M.** 2008. Genetic and molecular approaches to improve nutritional value of *Brassica napus* L. seed. *Comptes Rendus Biologies* **331**, 763–771.
- Neuhauser B, Dynowski M, Mayer M, Ludewig U.** 2007. Regulation of NH₄⁺ Transport by Essential Cross Talk between AMT Monomers through the Carboxyl Tails. *PLANT PHYSIOLOGY* **143**, 1651–1659.
- Nickrent DL, Duff RJ, Colwell AE, Wolfe AD, Young ND, Steiner KE, dePamphilis CW.** 1998. Molecular Phylogenetic and Evolutionary Studies of Parasitic Plants. In: Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ, eds. *Molecular Systematics of Plants II*. Springer US, 211–241.

Nicol GW, Leininger S, Schleper C, Prosser JI. 2008. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environmental Microbiology* **10**, 2966–2978.

Nicot A. 1959. La culture du chanvre en France, problèmes techniques et économiques posés par l'orobanche. Paris.

Nikiforova VJ. 2004. Towards dissecting nutrient metabolism in plants: a systems biology case study on sulphur metabolism. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1861–1870.

Nikiforova VJ. 2005. Systems Rebalancing of Metabolism in Response to Sulfur Deprivation, as Revealed by Metabolome Analysis of *Arabidopsis* Plants. *PLANT PHYSIOLOGY* **138**, 304–318.

Nikiforova V, Freitag J, Kempa S, Adamik M, Hesse H, Hoefgen R. 2003. Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *The Plant Journal* **33**, 633–650.

Noquet C, Avice JC, Rossato L, Beauclair P, Henry MP, Ourry A. 2004. Effects of altered source-sink relationships on N allocation and vegetative storage protein accumulation in *Brassica napus* L. *Plant Science* **166**, 1007–1018.

Nour-Eldin HH, Andersen TG, Burow M, Madsen SR, Jørgensen ME, Olsen CE, Dreyer I, Hedrich R, Geiger D, Halkier BA. 2012. NRT/PTR transporters are essential for translocation of glucosinolate defence compounds to seeds. *Nature* **488**, 531–534.

Novitskaya L, Trevanion SJ, Driscoll S, Foyer CH, Noctor G. 2002. How does photorespiration modulate leaf amino acid contents? A dual approach through modelling and metabolite analysis. *Plant, Cell & Environment* **25**, 821–835.

Nunes-Nesi A, Fernie AR, Stitt M. 2010. Metabolic and Signaling Aspects Underpinning the Regulation of Plant Carbon Nitrogen Interactions. *Molecular Plant* **3**, 973–996.

Nykiforuk CL, Johnson-Flanagan AM. 1999. Storage reserve mobilization during low temperature germination and early seedling growth in *Brassica napus*. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**, 939–947.

O'Leary MH. 1981. Carbon Isotopes in Photosynthesis. *BioScience* **38**, 328–336.

Okamoto M, Kumar A, Li W, Wang Y, Siddiqi MY, Crawford NM, Glass ADM. 2006. High-Affinity Nitrate Transport in Roots of *Arabidopsis* Depends on Expression of the NAR2-Like Gene AtNRT3.1. *PLANT PHYSIOLOGY* **140**, 1036–1046.

Okamoto M, Vidmar JJ, Glass AD. 2003. Regulation of NRT1 and NRT2 gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. *Plant and Cell Physiology* **44**, 304–317.

Oliveira IC. 2002. Overexpression of Cytosolic Glutamine Synthetase. Relation to Nitrogen, Light, and Photorespiration. *PLANT PHYSIOLOGY* **129**, 1170–1180.

Oliveira IC, Brenner E, Chiu J, Hsieh M-H, Kouranov A, Lam H-M, Shin MJ, Coruzzi G. 2001. Metabolite and light regulation of metabolism in plants: lessons from the study of a single biochemical pathway. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **34**, 567–575.

- Olmstead RG, Wolfe AD, Young ND, Elisons WJ, Reeves PA.** 2001. Disintegration of the *Scrophulariaceae*. *American Journal of Botany* **88**, 348–361.
- Orsel M, Chopin F, Leleu O, Smith SJ, Krapp A, Daniel-Vedele F, Miller A.** 2006. Characterization of Two-Component High-Affinity Nitrate Uptake System in *Arabidopsis*. *Physiology and Protein-Protein Interaction. Plant Physiol* **142**, 1304–1317.
- Orsel M, Eulenburg K, Krapp A, Daniel-Vedele F.** 2004. Disruption of the nitrate transporter genes AtNRT2.1 and AtNRT2.2 restricts growth at low external nitrate concentration. *Planta* **219**.
- Otegui MS, Noh Y-S, Martínez DE, Vila Petroff MG, Andrew Staehelin L, Amasino RM, Guiamet JJ.** 2005. Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean. *The Plant Journal* **41**, 831–844.
- Ozenda P, Capdebon M.** 1979. L' appareil haustorial des phanérogames parasites (1ère et 2ème parties). *Revue Generale de Botanique* **86**, 235–343.
- Pageau K, Simier P, Le Bizec B, Robins RJ, Fer A.** 2003. Characterization of nitrogen relationships between *Sorghum bicolor* and the root-hemiparasitic angiosperm *Striga hermonthica* (Del.) Benth. using $K^{15}NO_3$ as isotopic tracer. *Journal of Experimental Botany* **54**, 789–799.
- Pageau K, Simier P, Naulet N, Robins R, Fer A.** 1998. Carbon dependency of the hemiparasite *Striga hermonthica* on *Sorghum bicolor* determined by carbon isotopic and gas exchange analyses. *Functional Plant Biology* **25**, 695–700.
- Pal'ove-Balang P, Mistrík I.** 2002. Control of Nitrate Uptake by Phloem-Translocated Glutamine in *Zea mays* L. Seedlings. *Plant Biology* **4**, 440–445.
- Palmer AG, Gao R, Maresh J, Erbil WK, Lynn DG.** 2004. Chemical biology of multi-host/pathogen interactions: Chemical Perception and Metabolic Complementation. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 439–464.
- Papas A, Ingalls JR, Campbell LD.** 1979. Studies on the effects of rapeseed meal on thyroid status of cattle, glucosinolate and iodine content of milk and other parameters. *The Journal of nutrition* **109**, 1129–1139.
- Park JM, Manen JF, Schneeweiss GM.** 2007. Horizontal gene transfer of a plastid gene in the non-photosynthetic flowering plants *Orobanche* and *Phelipanche* (*Orobanchaceae*). *Molecular phylogenetics and evolution* **43**, 974–985.
- Parker C.** 2009. Observations on the current status of *Orobanche* and *Striga* problems worldwide. *Pest Management Science* **65**, 453–459.
- Parker C.** 2012. Parasitic Weeds: A World Challenge. *Weed Science* **60**, 269–276.
- Parker C, Riches CR.** 1993. Parasitic weeds of the world: biology and control. CAB International.
- Parmar S, Buchner P, Hawkesford MJ.** 2007. Leaf Developmental Stage Affects Sulfate Depletion and Specific Sulfate Transporter Expression During Sulfur Deprivation in *Brassica napus* L. *Plant Biology* **9**, 647–653.
- Pate JS, Sharkey PJ, Lewis OAM.** 1975. Xylem to phloem transfer of solutes in fruiting shoots of legumes, studied by a phloem bleeding technique. *Planta* **122**, 11–26.

- Patterson BW, Carraro F, Wolfe RR.** 1993. Measurement of ^{15}N enrichment in multiple amino acids and urea in a single analysis by gas chromatography/mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry* **22**, 518–523.
- Paungfoo-Lonhienne C, Lonhienne TG, Rentsch D, Robinson N, Christie M, Webb RI, Gamage HK, Carroll BJ, Schenk PM, Schmidt S.** 2008. Plants can use protein as a nitrogen source without assistance from other organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 4524–4529.
- Pennypacker BW, Nelson PE, Wilhelm S.** 1979. Anatomic Changes Resulting from the Parasitism of Tomato by *Orobanche ramosa*. *Phytopathology* **69**, 41–748.
- Pereira e Silva MC.** 2012. Fluctuations in ammonia oxidizing communities across agricultural soils are driven by soil structure and pH. *Frontiers in Microbiology* **3**.
- Pérez-de-Luque A.** 2006a. Protein cross-linking, peroxidase and -1,3-endoglucanase involved in resistance of pea against *Orobanche crenata*. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1461–1469.
- Pérez-de-Luque A.** 2006b. Mucilage production during the incompatible interaction between *Orobanche crenata* and *Vicia sativa*. *Journal of Experimental Botany* **57**, 931–942.
- Pérez-de-Luque A, Fondevilla S, Pérez-Vich B, Aly R, Thoiron S, Simier P, Castillejo MA, Fernandez-Martinez JM, Jorrín J, Rubiales D, et al.** 2009. Understanding *Orobanche* and *Phelipanche*-host plant interactions and developing resistance. *Weed Research* **49**, 8–22.
- Pérez-de-Luque A, Jorrín J, Cubero JI, Rubiales D.** 2005. *Orobanche crenata* resistance and avoidance in pea (*Pisum* spp.) operate at different developmental stages of the parasite. *Weed Research* **45**, 379–387.
- Pérez-de-Luque A, Moreno MT, Rubiales D.** 2008. Host plant resistance against broomrapes (*Orobanche* spp.): defence reactions and mechanisms of resistance. *Annals of Applied Biology* **152**, 131–141.
- Pérez-de-Luque A, Rubiales D.** 2009. Nanotechnology for parasitic plant control. *Pest Management Science* **65**, 540–545.
- Pérez-Vich B, Velasco L, Rich PJ, Ejeta G.** 2013. Marker-Assisted and Physiology-Based Breeding for Resistance to Root Parasitic *Orobanchaceae*. In: Joel DM, Gressel J, Musselman LJ, eds. *Parasitic Orobanchaceae*. Springer Berlin Heidelberg, 369–391.
- Péron T.** 2010. Caractérisation moléculaire et régulation de la force de puits de la plante parasite *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel vis-à-vis du saccharose prélevé chez son hôte.
- Péron T, Véronési C, Mortreau E, Pouvreau J-B, Thoiron S, Leduc N, Delavault P, Simier P.** 2012. Role of the sucrose synthase encoding PrSus1 gene in the development of the parasitic plant *Phelipanche ramosa* L.(Pomel). *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**, 402–411.
- Petersen B, Chen S, Hansen C, Olsen C, Halkier B.** 2002. Composition and content of glucosinolates in developing *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **214**, 562–571.
- Pickett JA, Hooper AM, Midega CAO, Khan ZR.** 2013. Allelopathy. In: Joel DM, Gressel J, Musselman LJ, eds. *Parasitic Orobanchaceae*. Springer Berlin Heidelberg, 459–467.

- Piednoël M, Aberer AJ, Schneeweiss GM, Macas J, Novak P, Gundlach H, Temsch EM, Renner SS.** 2012. Next-Generation Sequencing Reveals the Impact of Repetitive DNA Across Phylogenetically Closely Related Genomes of *Orobanchaceae*. *Molecular Biology and Evolution* **29**, 3601–3611.
- Piednoël M, Carrete-Vega G, Renner SS.** 2013. Characterization of the LTR retrotransposon repertoire of a plant clade of six diploid and one tetraploid species. *The Plant Journal*, **75**, 699–709.
- Pin PA, Nilsson O.** 2012. The multifaceted roles of FLOWERING LOCUS T in plant development: FT, a multifunctional protein. *Plant, Cell & Environment* **35**, 1742–1755.
- Plakhine D, Tadmor Y, Ziadne H, Joel DM.** 2012. Maternal tissue is involved in stimulant reception by seeds of the parasitic plant *Orobanche*. *Annals of Botany* **109**, 979–986.
- Plaza L.** 2004. Micromorphological Studies on Seeds of *Orobanche* Species from the Iberian Peninsula and the Balearic Islands, and Their Systematic Significance. *Annals of Botany* **94**, 167–178.
- Polacco JC, Mazzafera P, Tezotto T.** 2013. Opinion – Nickel and urease in plants: Still many knowledge gaps. *Plant Science* **199-200**, 79–90.
- Porter GA, Knievel DP, Shannon JC.** 1985. Sugar efflux from maize (*Zea mays* L.) pedicel tissue. *Plant physiology* **77**, 524–531.
- Potel F, Valadier M-H, Ferrario-Méry S, Grandjean O, Morin H, Gaufichon L, Boutet-Mercey S, Lothier J, Rothstein SJ, Hirose N, et al.** 2009. Assimilation of excess ammonium into amino acids and nitrogen translocation in *Arabidopsis thaliana* - roles of glutamate synthases and carbamoylphosphate synthetase in leaves. *FEBS Journal* **276**, 4061–4076.
- Pourtau N, Marès M, Purdy S, Quentin N, Ruël A, Wingler A.** 2004. Interactions of abscisic acid and sugar signalling in the regulation of leaf senescence. *Planta* **219**.
- Pouvreau J-B, Gaudin Z, Auger B, Lechat M-M, Gauthier M, Delavault P, Simier P.** 2013. A high-throughput seed germination assay for root parasitic plants. *Plant Methods* **9**, 32.
- Press MC, Graves JD.** 1995. *Parasitic Plants*. Springer.
- Privat G, Andary C.** 1973. Considerations sur les relations histologiques hôte-parasite chez l'orobanche du lierre (*Orobanche hederæ* Duby). *Proc. Eur. Weed Res. Coun., Symp. Parasitic Weeds. Malta*. 99–105.
- Prosser IM, Purves JV, Saker LR, Clarkson DT.** 2001. Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate. *Journal of Experimental Botany* **52**, 113–121.
- Provan F, Lillo C.** 1999. Photosynthetic Post-Translational Activation of Nitrate Reductase. *Journal of Plant Physiology* **154**, 605–609.
- Puig J, Pauluzzi G, Guiderdoni E, Gantet P.** 2012. Regulation of Shoot and Root Development through Mutual Signaling. *Molecular Plant*.

- Pujadas-Salvà AJ, Velasco L.** 2000. Comparative studies on *Orobancha cernua* L. and *O. cumana* Wallr. (*Orobanchaceae*) in the Iberian Peninsula. *Botanical Journal of the Linnean Society* **134**, 513–527.
- Qasem JR.** 2006. Recent advances in parasitic weed research: an overview. , 627–769.
- Qasem JR.** 2009. Parasitic weeds of the *Orobanchaceae* family and their natural hosts in Jordan. *Weed Biology and Management* **9**, 112–122.
- Qasem JR, Foy CL.** 2007. Screening studies on the host range of branched broomrape (*Orobancha ramosa*). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **82**, 885–892.
- Qasem JR, Kasrawi MA.** 1995. Variation of resistance to broomrape (*Orobancha ramosa*) in tomatoes. *Euphytica* **81**, 109–114.
- Quilleré I, Tribouï-Blondel AM.** 1988. Assimilate movements in winter rape: I. Allocation to roots and the influence of cultivation techniques. , 54–58.
- Radojčić Redovniković I, Glivetić T, Delonga K, Vorkapić-Furac J.** 2008. Glucosinolates and their potential role in plant. *Periodicum biologorum* **110**, 297–309.
- Radwan O, Bouzidi MF, Vear F, Philippon J, de Labrouhe DT, Nicolas P, Mouzeyar S.** 2003. Identification of non-TIR-NBS-LRR markers linked to the PI5/PI8 locus for resistance to downy mildew in sunflower. *Theoretical and applied genetics* **106**, 1438–1446.
- Radwan O, Gandhi S, Heesacker A, Whitaker B, Taylor C, Plocik A, Kesseli R, Kozik A, Michelmore RW, Knapp SJ.** 2008. Genetic diversity and genomic distribution of homologs encoding NBS-LRR disease resistance proteins in sunflower. *Molecular Genetics and Genomics* **280**, 111–125.
- Ramírez EC, Whitaker JR.** 1999. Biochemical Characterization of Cystine Lyase from Broccoli (*Brassica oleracea* Var. *italica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 2218–2225.
- Randle WM, Lancaster JE, Shaw ML, Sutton KH, Hay RL, Bussard ML.** 1995. Quantifying onion flavor compounds responding to sulfur fertility-sulfur increases levels of alk(en)yl cysteine sulfoxides and biosynthetic intermediates. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **120**, 1075–1081.
- Rasmussen A, Heugebaert T, Matthys C, Van Deun R, Boyer F-D, Goormachtig S, Stevens C, Geelen D.** 2012. A Fluorescent Alternative to the Synthetic Strigolactone GR24. *Molecular Plant* **6**, 100–112.
- Rathke G, Behrens T, Diepenbrock W.** 2006. Integrated nitrogen management strategies to improve seed yield, oil content and nitrogen efficiency of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **117**, 80–108.
- Reda M.** 2013. Regulation of nitrate reduction in *Arabidopsis* WT and *hxx1* mutant under C and N metabolites. *Physiologia Plantarum*, **149** (2), 260-272.
- Redinbaugh MG, Campbell W.** 1998. Nitrate regulation of the oxidative pentose phosphate pathway in maize (*Zea mays* L.) root plastids: induction of 6-phosphogluconate dehydrogenase activity, protein and transcript levels. *Plant Science* **134**, 129–140.

- Rehker J, Lachnit M, Kaldenhoff R.** 2012. Molecular convergence of the parasitic plant species *Cuscuta reflexa* and *Phelipanche aegyptiaca*. *Planta* **236**, 557–566.
- Remans T, Nacry P, Pervent M, Filleur S, Diatloff E, Mounier E, Tillard P, Forde BG, Gojon A.** 2006a. The Arabidopsis NRT1. 1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 19206–19211.
- Remans T, Nacry P, Pervent M, Girin T, Tillard P, Lepetit M, Gojon A.** 2006b. A Central Role for the Nitrate Transporter NRT2.1 in the Integrated Morphological and Physiological Responses of the Root System to Nitrogen Limitation in Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY* **140**, 909–921.
- Rentsch D, Schmidt S, Tegeder M.** 2007. Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. *FEBS letters* **581**, 2281–2289.
- Rey L, Thalouarn P, Fer A, Renaudin S.** 1990. About the capacity of achlorophyllous parasitic flowering plants to assimilate inorganic forms of carbon and nitrogen. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* **65**, 429–441.
- Rhodes D, Rich PJ, Brunk DG.** 1989. Amino acid metabolism of *Lemna minor* L. IV. ¹⁵N-labeling kinetics of the amide and amino groups of glutamine and asparagine. *Plant physiology* **89**, 1161–1171.
- Riedel J, Tischner R, Mäck G.** 2001. The chloroplastic glutamine synthetase (GS-2) of tobacco is phosphorylated and associated with 14-3-3 proteins inside the chloroplast. *Planta* **213**, 396–401.
- Riens B, Lohaus G, Heineke D, Heldt HW.** 1991. Amino acid and sucrose content determined in the cytosolic, chloroplastic, and vacuolar compartments and in the phloem sap of spinach leaves. *Plant Physiology* **97**, 227.
- Robinson SA, Slade AP, Fox GG, Phillips R, Ratcliffe RG, Stewart GR.** 1991. The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. *Plant physiology* **95**, 509–516.
- Rochat C, Boutin J-P.** 1991. Metabolism of Phloem-borne Amino Acids in Maternal Tissues (*Pisum sativum* L.). *Journal of Experimental Botany* **42**, 207–214.
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM.** 2002. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Botany* **53**, 103–110.
- Rogers WE, Nelson RR.** 1962. Penetration and nutrition of *Striga asiatica*. *Phytopathology* **52**, 1064–70.
- Román B, Satovic Z, Alfaro C, Moreno MT, Kharrat M, Pérez-de-Luque A, Rubiales D.** 2007. Host differentiation in *Orobancha foetida* Poir. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **202**, 201–208.
- Román B, Torres AM, Rubiales D, Cubero JI, Satovic Z.** 2002. Mapping of quantitative trait loci controlling broomrape (*Orobancha crenata* Forsk.) resistance in faba bean (*Vicia faba* L.). *Genome* **45**, 1057–1063.

- Roney JK, Khatibi PA, Westwood JH.** 2006. Cross-Species Translocation of mRNA from Host Plants into the Parasitic Plant Dodder. *PLANT PHYSIOLOGY* **143**, 1037–1043.
- Rosales EP, Iannone MF, Groppa MD, Benavides MP.** 2011a. Nitric oxide inhibits nitrate reductase activity in wheat leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* **49**, 124–130.
- Rosales EP, Iannone MF, Groppa MD, Benavides MP.** 2011b. Polyamines modulate nitrate reductase activity in wheat leaves: involvement of nitric oxide. *Amino Acids* **42**, 857–865.
- Rossato L, Dantec CL, Laine P, Ourry A.** 2002. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: identification, characterization and immunolocalization of a putative taproot storage glycoprotein. *Journal of Experimental Botany* **53**, 265–275.
- Rossato L, Lainé P, Ourry A.** 2001. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1655–1663.
- Rubiales D, Fernández-Aparicio M.** 2012. Innovations in parasitic weeds management in legume crops. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **32**, 433–449.
- Rubiales D, Pérez-de-Luque A, Cubero J., Sillero J.** 2003. Crenate broomrape (*Orobancha crenata*) infection in field pea cultivars. *Crop Protection* **22**, 865–872.
- Rubiales D, Pérez-de-Luque A, Fernández-Aparicio M, Sillero JC, Román B, Kharrat M, Khalil S, Joel DM, Riches C.** 2006. Screening techniques and sources of resistance against parasitic weeds in grain legumes. *Euphytica* **147**, 187–199.
- Rubiales D, Sadiki M, Román B.** 2005. First Report of *Orobancha foetida* on Common Vetch (*Vicia sativa*) in Morocco. *Plant Disease* **89**, 528–528.
- Ruffel S, Krouk G, Ristova D, Shasha D, Birnbaum KD, Coruzzi GM.** 2011. Nitrogen economics of root foraging: Transitive closure of the nitrate-cytokinin relay and distinct systemic signaling for N supply vs. demand. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 18524–18529.
- Rumberger A, Marschner P.** 2003. 2-Phenylethylisothiocyanate concentration and microbial community composition in the rhizosphere of canola. *Soil Biology and Biochemistry* **35**, 445–452.
- Rumberger A, Marschner P.** 2004. 2-Phenylethylisothiocyanate concentration and bacterial community composition in the rhizosphere of field-grown canola. *Functional plant biology* **31**, 623–631.
- Saito K.** 2000. Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino acids. *Current opinion in plant biology* **3**, 188–195.
- Sakakibara H, Takei K, Hirose N.** 2006. Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. *Trends in Plant Science* **11**, 440–448.
- Salazar C, Armenta JM, Cortés DF, Shulaev V.** 2012a. Combination of an AccQ-Tag-Ultra Performance Liquid Chromatographic Method with Tandem Mass Spectrometry for the Analysis of Amino Acids. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **828**, 13.

- Salazar C, Armenta JM, Shulaev V.** 2012b. An UPLC-ESI-MS/MS Assay Using 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate Derivatization for Targeted Amino Acid Analysis: Application to Screening of *Arabidopsis thaliana* Mutants. *Metabolites* **2**, 398–428.
- Sánchez E, López-Lefebvre LR, García PC, Rivero RM, Ruiz JM, Romero L.** 2001. Proline metabolism in response to highest nitrogen dosages in green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike). *Journal of plant physiology* **158**, 593–598.
- Sarwat M, Naqvi AR, Ahmad P, Ashraf M, Akram NA.** 2013. Phytohormones and microRNAs as sensors and regulators of leaf senescence: Assigning macro roles to small molecules. *Biotechnology Advances*.
- Sato D, Awad AA, Takeuchi Y, Yoneyama K.** 2005. Confirmation and Quantification of Strigolactones, Germination Stimulants for Root Parasitic Plants *Striga* and *Orobanche*, Produced by Cotton. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **69**, 98–102.
- Satovic Z, Joel DM, Rubiales D, Cubero JI, Román B.** 2009. Population genetics in weedy species of *Orobanche*. *Australasian Plant Pathology* **38**, 228–234.
- Sauerborn J, Müller-Stöver D, Hershenthorn J.** 2007. The role of biological control in managing parasitic weeds. *Crop Protection* **26**, 246–254.
- Sausse C, Wagner D, Lucas J-L, Estragnat A, Mangelot O, Garric B, Reau R, Devaux C, Champolivier J, Messéan A.** 2006. Estimation des pertes à la récolte du colza d’hiver (*Brassica napus*) dans des conditions variées. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* **13**, 431–438.
- Sauzet G, Landé N, Charbonnaud J.** 2013. Colza conduit avec un couvert associé : Premier résultats 2013, *Région Centre*.
- Scheible W-R.** 2004. Genome-Wide Reprogramming of Primary and Secondary Metabolism, Protein Synthesis, Cellular Growth Processes, and the Regulatory Infrastructure of *Arabidopsis* in Response to Nitrogen. *PLANT PHYSIOLOGY* **136**, 2483–2499.
- Scheible W-R, Gonzalez-Fontes A, Lauerer M, Muller-Rober B, Caboche M, Stitt M.** 1997. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *The Plant Cell Online* **9**, 783–798.
- Schjoerring JK, Bock JGH, Gammelvind L, Jensen CR, Mogensen VO.** 1995. Nitrogen incorporation and remobilization in different shoot components of field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) as affected by rate of nitrogen application and irrigation. *Plant and Soil* **177**, 255–264.
- Schneeweiss GM, Colwell A, Park J-M, Jang C-G, Stuessy TF.** 2004a. Phylogeny of holoparasitic *Orobanche* (*Orobanchaceae*) inferred from nuclear ITS sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **30**, 465–478.
- Schneeweiss GM, Palomeque T, Colwell AE, Weiss-Schneeweiss H.** 2004b. Chromosome numbers and karyotype evolution in holoparasitic *Orobanche* (*Orobanchaceae*) and related genera. *American journal of botany* **91**, 439–448.
- Schnug E, Haneklaus S.** Sulphur deficiency symptoms in oilseed rape (*Brassica napus* L.): The aesthetics of starvation. *Phyton* **45**, 79–95.

- Scholes JD, Press MC.** 2008. *Striga* infestation of cereal crops – an unsolved problem in resource limited agriculture. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 180–186.
- Schreiner M, Krumbein A, Knorr D, Smetanska I.** 2011. Enhanced Glucosinolates in Root Exudates of *Brassica rapa* ssp. *rapa* Mediated by Salicylic Acid and Methyl Jasmonate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 1400–1405.
- Schubert KR.** 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. *Annual review of plant physiology* **37**, 539–574.
- Secomb N, Preston C, Watts JH, Crossman ND.** 2006. Defining the distribution of branched broomrape (*Orobanche ramosa* L.) by tracing the movement of potential vectors for the spread of seed. 15th Australian Weeds Conference, Adelaide, September.614–617.
- Segonzac C, Boyer J-C, Ipotesi E, Szponarski W, Tillard P, Touraine B, Sommerer N, Rossignol M, Gibrat R.** 2007. Nitrate Efflux at the Root Plasma Membrane: Identification of an *Arabidopsis* Excretion Transporter. *THE PLANT CELL ONLINE* **19**, 3760–3777.
- Serghini K, Luque AP de, Castejón-Muñoz M, García-Torres L, Jorrín JV.** 2001. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to broomrape (*Orobanche cernua* Loefl.) parasitism: induced synthesis and excretion of 7-hydroxylated simple coumarins. *Journal of Experimental Botany* **52**, 2227–2234.
- Shelp BJ.** 2012. Does long-distance GABA signaling via the phloem really occur? *Botany* **90**, 897–900.
- Shen H, Ye W, Hong L, Huang H, Wang Z, Deng X, Yang Q, Xu Z.** 2006. Progress in Parasitic Plant Biology: Host Selection and Nutrient Transfer. *Plant Biology* **8**, 175–185.
- Shin R, Jez JM, Basra A, Zhang B, Schachtman DP.** 2011. 14-3-3 Proteins fine-tune plant nutrient metabolism. *FEBS Letters* **585**, 143–147.
- Shindrova P, Kostov A.** 2009. Broomrape as a future problem for oilseed rape production in Bulgaria.61.
- Shrif MAA, Murdoch AJ, Mueller-Harvey I.** 2013. Effects of Desmodium root exudates on *Phelipanche ramosa* and *Orobanche crenata* and their associated hosts. *Proceedings of the 12th World Congress on Parasitic Plants*. Sheffield, UK, 69.
- Signora L, De Smet I, Foyer CH, Zhang H.** 2001. ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **28**, 655–662.
- Sillero JC, Villegas-Fernández AM, Thomas J, Rojas-Molina MM, Emeran AA, Fernández-Aparicio M, Rubiales D.** 2010. Faba bean breeding for disease resistance. *Field Crops Research* **115**, 297–307.
- Simier P, Fer A, Renaudin S.** 1993. Identification of the Main Osmotically Active Solutes in the Unstressed and Water-Stressed Root-Hemiparasitic Angiosperm *Thesium humile* and Its Host *Triticum vulgare*. *Functional Plant Biology* **20**, 223–230.
- Singh M, Singh DV, Misra PC, Tewari KK, Krishnan PS.** 1968. Biochemical Aspects of Parasitism by the Angiosperm Parasites: Starch Accumulation. *Physiologia Plantarum* **21**, 525–538.

- Slavov S, van Onckelen H, Batchvarova R, Atanassov A, Prinsen E.** 2004. IAA production during germination of *Orobancha* spp. seeds. *Journal of Plant Physiology* **161**, 847–853.
- Slavov S, Valkov V, Batchvarova R, Atanassova S, Alexandrova M, Atanassov A.** 2005. Chlorsulfuron resistant transgenic tobacco as a tool for broomrape control. *Transgenic Research* **14**, 273–278.
- De Smet I, Zhang H, Inzé D, Beeckman T.** 2006. A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends in Plant Science* **11**, 434–439.
- Smetanska I.** 2005. Impact of elicitors on glucosinolate production in plants and exudates of turnip (*Brassica rapa*).
- Smith JD, De Moraes CM, Mescher MC.** 2013. Parasitic plants imbibe host plant toxins that influence insect herbivores. Proceedings of the 12th World Congress on Parasitic Plants. Sheffield, UK, 47.
- Sobrino-Vesperinas E.** 1985. Search for resistance to *Orobancha ramosa* L. in rapeseed. *Cruciferae Newsletter*.
- Solecka D, Kacperska A.** 1995. Phenylalanine ammonia-lyase activity in leaves of winter oilseed rape plants as affected by acclimation of plants to low temperature. *Plant physiology and biochemistry* **33**, 585–591.
- Spreitzer RJ, Salvucci ME.** 2002. RuBisCO : Structure, Regulatory Interactions, and Possibilities for a Better Enzyme. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 449–475.
- Srivastava HS, Shankar N.** 1996. Molecular biology and biotechnology of higher plant nitrate reductases. *CURRENT SCIENCE-BANGALORE*- **71**, 702–709.
- Stadler R.** 2005. Cell-to-Cell Movement of Green Fluorescent Protein Reveals Post-Phloem Transport in the Outer Integument and Identifies Symplastic Domains in Arabidopsis Seeds and Embryos. *PLANT PHYSIOLOGY* **139**, 701–712.
- Stessman D, Miller A, Spalding M, Rodermeil S.** 2002. Regulation of photosynthesis during Arabidopsis leaf development in continuous light. *Photosynthesis research* **72**, 27–37.
- Stitt M, Feil R.** 1999. Lateral root frequency decreases when nitrate accumulates in tobacco transformants with low nitrate reductase activity: consequences for the regulation of biomass partitioning between shoots and root1. *Plant and Soil* **215**, 143–153.
- Stoewsand G.** 1995. Bioactive organosulfur phytochemicals in *Brassica oleracea* vegetables—a review. *Food and chemical toxicology* **33**, 537–543.
- Sugimoto Y, Ali AM, Yabuta S, Kinoshita H, Inanaga S, Itai A.** 2003. Germination strategy of *Striga hermonthica* involves regulation of ethylene biosynthesis. *Physiologia Plantarum* **119**, 137–145.
- Sun Z.** 2008. Biosynthesis of germination stimulants of parasitic weeds *Striga* and *Orobancha*.
- Surov T, Aviv D, Aly R, Joel DM, Goldman-Guez T, Gressel J.** 1998. Generation of transgenic asulam-resistant potatoes to facilitate eradication of parasitic broomrapes (*Orobancha* spp.), with the sul gene as the selectable marker. *Theoretical and Applied Genetics* **96**, 132–137.

- Svennerstam H, Ganeteg U, Näsholm T.** 2008. Root uptake of cationic amino acids by *Arabidopsis* depends on functional expression of amino acid permease 5. *New Phytologist* **180**, 620–630.
- Swarbreck SM, Defoin-Platel M, Hindle M, Saqi M, Habash DZ.** 2010. New perspectives on glutamine synthetase in grasses. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1511–1522.
- Sylvester-Bradley R, Makepeace RJ.** 1985. Revision of a code for stages of development in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Aspects of Applied Biology* **10**, 395–400.
- Szabados L, Savouré A.** 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* **15**, 89–97.
- Szczerba MW, Britto DT, Balkos KD, Kronzucker HJ.** 2008. Alleviation of rapid, futile ammonium cycling at the plasma membrane by potassium reveals K⁺-sensitive and -insensitive components of NH₄⁺ transport. *Journal of Experimental Botany* **59**, 303–313.
- Tadano T, Tanaka A.** 1980. The effect of low phosphate concentrations in culture medium on early growth of several crop plants. *Jpn J Soil Sci Plant Nutr* **51**, 399–404.
- Taiz L, Zeiger E.** 2010. *Plant Physiology* 5th Edition. Sinauer Associates, Inc.
- Takagi K, Okazawa A, Wada Y, Mongkolchaiyaphruek A, Fukusaki E, Yoneyama K, Takeuchi Y, Kobayashi A.** 2009. Unique phytochrome responses of the holoparasitic plant *Orobancha minor*. *New Phytologist* **182**, 965–974.
- Takahashi H, Kopriva S, Giordano M, Saito K, Hell R.** 2011. Sulfur Assimilation in Photosynthetic Organisms: Molecular Functions and Regulations of Transporters and Assimilatory Enzymes. *Annual Review of Plant Biology* **62**, 157–184.
- Tan S, Evans RR, Dahmer ML, Singh BK, Shaner DL.** 2005. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Management Science* **61**, 246–257.
- Tan XW, Ikeda H, Oda M.** 1999. Absorption, translocation, and assimilation of foliar-applied urea compared with nitrate and ammonium in tomato plants. *Soil Science and Plant Nutrition* **45**, 609–616.
- Tan XW, Ikeda H, Oda M.** 2000. Effects of nickel concentration in the nutrient solution on the nitrogen assimilation and growth of tomato seedlings in hydroponic culture supplied with urea or nitrate as the sole nitrogen source. *Scientia Horticulturae* **84**, 265–273.
- Tan Q, Zhang L, Grant J, Cooper P, Tegeder M.** 2010. Increased Phloem Transport of S-Methylmethionine Positively Affects Sulfur and Nitrogen Metabolism and Seed Development in Pea Plants. *PLANT PHYSIOLOGY* **154**, 1886–1896.
- Tcherkez G, Hodges M.** 2007. How stable isotopes may help to elucidate primary nitrogen metabolism and its interaction with (photo)respiration in C₃ leaves. *Journal of Experimental Botany* **59**, 1685–1693.
- Tegeder M.** 2012. Transporters for amino acids in plant cells: some functions and many unknowns. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, 315–321.

- Tegeder M, Rentsch D.** 2010. Uptake and Partitioning of Amino Acids and Peptides. *Molecular Plant* **3**, 997–1011.
- Teixeira J.** 2005. Glutamine synthetase of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Desiree) plants: cell- and organ-specific expression and differential developmental regulation reveal specific roles in nitrogen assimilation and mobilization. *Journal of Experimental Botany* **56**, 663–671.
- Teryokhin ES.** 1997. Weed broomrapes: systematics, ontogenesis, biology, evolution. Germany: Aufsteig-Verlag x, 182p.-illus.. ISBN 3761202547 En Icones, Anatomy and morphology, Reproductive biology. Transl. from Russian. Geog= 0 Systematics: *ANGIOSPERMAE (SCROPHULARIACEAE)*(KR, 199605465).
- Teryokhin ES, Schibakina GV, Szaphimovich NB, Kravtsova TJ.** 1993. Determinator of Broomrapes of the USSR Flora.
- Tholen D, Pons TL, Voeselek LACJ, Poorter H.** 2007. Ethylene Insensitivity Results in Down-Regulation of Rubisco Expression and Photosynthetic Capacity in Tobacco. *PLANT PHYSIOLOGY* **144**, 1305–1315.
- Thomas DJ, Parkin KL.** 1994. Quantification of alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides and related amino acids in alliums by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42**, 1632–1638.
- Thompson AR, Vierstra RD.** 2005. Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 165–173.
- Thorogood C, Hiscock S.** 2010. Specific developmental pathways underlie host specificity in the parasitic plant *Orobancha*. *Plant signaling & behavior* **5**, 275–277.
- Thorogood CJ, Rumsey FJ, Hiscock SJ.** 2009. Host-specific races in the holoparasitic angiosperm *Orobancha minor*: implications for speciation in parasitic plants. *Annals of Botany* **103**, 1005–1014.
- Thum KE.** 2003. Light- and Carbon-Signaling Pathways. Modeling Circuits of Interactions. *PLANT PHYSIOLOGY* **132**, 440–452.
- Thurling N.** 1974. Morphophysiological determinants of yield in rapeseed (*Brassica campestris* and *Brassica napus*). I. Growth and morphological characters. *Australian Journal of Agricultural Research* **25**, 697–710.
- Tian Q, Chen F, Liu J, Zhang F, Mi G.** 2008. Inhibition of maize root growth by high nitrate supply is correlated with reduced IAA levels in roots. *Journal of Plant Physiology* **165**, 942–951.
- Tilsner J, Kassner N, Struck C, Lohaus G.** 2005. Amino acid contents and transport in oilseed rape (*Brassica napus* L.) under different nitrogen conditions. *Planta* **221**, 328–338.
- Tischner R.** 2000. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant, Cell & Environment* **23**, 1005–1024.
- Tittonel ED, Chaput JP, Letoublon F, Bonnot O.** 1988. Reprise au printemps et mise a fleurs chez le colza d'hiver. Colza, Physiologie et Elaboration du rendement. Supplément à Informations Techniques **103**, 68-72

- Toh S, Kamiya Y, Kawakami N, Nambara E, McCourt P, Tsuchiya Y.** 2012. Thermoinhibition uncovers a role for strigolactones in *Arabidopsis* seed germination. *Plant and Cell Physiology* **53**, 107–117.
- Tomilov AA.** 2005. Localized Hormone Fluxes and Early Haustorium Development in the Hemiparasitic Plant *Triphysaria versicolor*. *PLANT PHYSIOLOGY* **138**, 1469–1480.
- Tomilov AA, Tomilova NB, Wroblewski T, Michelmore R, Yoder JI.** 2008. Trans-specific gene silencing between host and parasitic plants. *The Plant Journal* **56**, 389–397.
- Touraine B, Daniel-Vedele F, Forde BG.** 2001. Nitrate Uptake and Its Regulation. In: Lea PDPJ, Morot-Gaudry J-F, eds. *Plant Nitrogen*. Springer Berlin Heidelberg, 1–36.
- Touraine B, Muller B, Grignon C.** 1992. Effect of Phloem-Translocated Malate on NO₃⁻ Uptake by Roots of Intact Soybean Plants. *Plant physiology* **99**, 1118–1123.
- Tourna M, Freitag TE, Nicol GW, Prosser JI.** 2008. Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environmental Microbiology* **10**, 1357–1364.
- Tranbarger TJ, AL-GHAZI Y, Muller B, Teysseidier De La Serve B, Doumas P, Touraine B.** 2003. Transcription factor genes with expression correlated to nitrate-related root plasticity of *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* **26**, 459–469.
- Trotin V, Ginestière Y.** 2012. Cultiver du colza d’hiver en association avec des plantes de service. Chambres régionale d’agriculture Poitou-Charentes.
- Tsay Y-F, Chiu C-C, Tsai C-B, Ho C-H, Hsu P-K.** 2007. Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters* **581**, 2290–2300.
- Tsay Y-F, Ho C-H, Chen H-Y, Lin S-H.** 2011. Integration of Nitrogen and Potassium Signaling. *Annual Review of Plant Biology* **62**, 207–226.
- Tsialtas JT, Eleftherohorinos IG.** 2011. First Report of Branched Broomrape (*Orobanche ramosa*) on Oilseed Rape (*Brassica napus*), Wild Mustard (*Sinapis arvensis*), and Wild Vetch (*Vicia* spp.) in Northern Greece. *Plant Disease* **95**, 1322–1322.
- Tsikis D.** 2007. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B* **851**, 51–70.
- Tun NN.** 2006. Polyamines Induce Rapid Biosynthesis of Nitric Oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* Seedlings. *Plant and Cell Physiology* **47**, 346–354.
- Turgeon R.** 2006. Phloem Loading: How Leaves Gain Their Independence. *BioScience* **56**, 15.
- Turgeon R, Medville R.** 2004. Phloem loading. A reevaluation of the relationship between plasmodesmatal frequencies and loading strategies. *Plant Physiology* **136**, 3795.
- Tzin.** 2010. The Biosynthetic Pathways for Shikimate and Aromatic Amino Acids in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book*.

- U Nagaharu.** 1935. Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Jap J Bot* **7**, 389–452.
- Uematsu K, Nakajima M, Yamaguchi I, Yoneyama K, Fukui Y.** 2007. Role of cAMP in Gibberellin Promotion of Seed Germination in *Orobanche minor* Smith. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**, 245–254.
- Ueno K, Fujiwara M, Nomura S, Mizutani M, Sasaki M, Takikawa H, Sugimoto Y.** 2011. Structural Requirements of Strigolactones for Germination Induction of *Striga gesnerioides* Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 9226–9231.
- Ulas A, Behrens T, Wiesler F, Horst WJ, Schulte auf'm Erley G.** 2013. Does genotypic variation in nitrogen remobilisation efficiency contribute to nitrogen efficiency of winter oilseed-rape cultivars (*Brassica napus* L.)? *Plant and Soil*.
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, et al.** 2008. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**, 195–200.
- Vachev T, Ivanova D, Minkov I, Tsagris M, Gozmanova M.** 2010. Trafficking of the Potato spindle tuber viroid between tomato and *Orobanche ramosa*. *Virology* **399**, 187–193.
- Valderrama MR, Román B, Satovic Z, Rubiales D, Cubero JI, Torres AM.** 2004. Locating quantitative trait loci associated with *Orobanche crenata* resistance in pea. *Weed Research* **44**, 323–328.
- Véronési C, Bonnin E, Calvez S, Thalouarn P, Simier P.** 2007. Activity of secreted cell wall-modifying enzymes and expression of peroxidase-encoding gene following germination of *Orobanche ramosa*. *Biologia plantarum* **51**, 391–394.
- Véronési C, Delavault P, Simier P.** 2009. Acibenzolar-S-methyl induces resistance in oilseed rape (*Brassica napus* L.) against branched broomrape (*Orobanche ramosa* L.). *Crop Protection* **28**, 104–108.
- Vidal EA, Arous V, Lu C, Parry G, Green PJ, Coruzzi GM, Gutierrez RA.** 2010. Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 4477–4482.
- Vidmar JJ, Zhuo D, Siddiqi MY, Schjoerring JK, Touraine B, Glass AD.** 2000. Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. *Plant Physiology* **123**, 307–318.
- Vieira Dos Santos C, Delavault P, Letousey P, Thalouarn P.** 2003a. Identification by suppression subtractive hybridization and expression analysis of *Arabidopsis thaliana* putative defence genes during *Orobanche ramosa* infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **62**, 297–303.
- Vieira Dos Santos C, Letousey P, Delavault P, Thalouarn P.** 2003b. Defense gene expression analysis of *Arabidopsis thaliana* parasitized by *Orobanche ramosa*. *Phytopathology* **93**, 451–457.
- Vigeolas H, Waldeck P, Zank T, Geigenberger P.** 2007. Increasing seed oil content in oil-seed rape (*Brassica napus* L.) by over-expression of a yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenase under the control of a seed-specific promoter. *Plant Biotechnology Journal* **5**, 431–441.

- Vincill ED, Clarin AE, Molenda JN, Spalding EP.** 2013. Interacting Glutamate Receptor-Like Proteins in Phloem Regulate Lateral Root Initiation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **25**, 1304–1313.
- Virtue JG, DeDear C, Potter MJ, Rieger M.** 2006. Potential use of isothiocyanates in branched broomrape eradication. 15th Australian Weeds Conference, Adelaide, September.629–632.
- Voisin M, Duffé P, Hadjou F, Delavault P, Delourme R, Simier P.** 2011. Host specificity and genetic diversity of the parasitic plant *Phelipanche ramosa* on winter oilseed rape in France. Prague, Czech Republic, .
- Vrânceanu AV, Tudor VA, Stoenescu FM, Pirvu N.** 1980. Virulence groups of *Orobancha cumana* Wallr. differential hosts and resistance sources and genes in sunflower. Proceedings of the 9th International Sunflower Conference. Torremolinos, Spain, 74–80.
- Vurro M, Boari A, Pilgeram AL, Sands DC.** 2006. Exogenous amino acids inhibit seed germination and tubercle formation by *Orobancha ramosa* (Broomrape): Potential application for management of parasitic weeds. *Biological Control* **36**, 258–265.
- Walch-Liu P.** 2006. Nitrogen Regulation of Root Branching. *Annals of Botany* **97**, 875–881.
- Walch-Liu P, Forde BG.** 2008. Nitrate signalling mediated by the NRT1.1 nitrate transporter antagonises l-glutamate-induced changes in root architecture. *The Plant Journal* **54**, 820–828.
- Wang R.** 2004. Genomic Analysis of the Nitrate Response Using a Nitrate Reductase-Null Mutant of *Arabidopsis*. *PLANT PHYSIOLOGY* **136**, 2512–2522.
- Wang R, Guan P, Chen M, Xing X, Zhang Y, Crawford NM.** 2010. Multiple Regulatory Elements in the *Arabidopsis* NIA1 Promoter Act Synergistically to Form a Nitrate Enhancer. *PLANT PHYSIOLOGY* **154**, 423–432.
- Wang Y-Y, Hsu P-K, Tsay Y-F.** 2012. Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends in plant science*.
- Wang Y-Y, Tsay Y-F.** 2011. *Arabidopsis* Nitrate Transporter NRT1.9 Is Important in Phloem Nitrate Transport. *The Plant Cell* **23**, 1945–1957.
- Wang R, Xing X, Wang Y, Tran A, Crawford NM.** 2009. A Genetic Screen for Nitrate Regulatory Mutants Captures the Nitrate Transporter Gene NRT1.1. *PLANT PHYSIOLOGY* **151**, 472–478.
- Watanabe M, Yumi O, Itoh Y, Yasuda K, Kamachi K, Ratcliffe RG.** 2011. Deamination role of inducible glutamate dehydrogenase isoenzyme 7 in *Brassica napus* leaf protoplasts. *Phytochemistry* **72**, 587–593.
- Wegmann K.** 1986. Biochemistry of osmoregulation and possible biochemical reasons of resistance against *Orobancha*. Landbouwniversiteit, .
- Weisler F, Behrens T, Horst WJ.** 2001. The Role of Nitrogen-Efficient Cultivars in Sustainable Agriculture. *The Scientific World JOURNAL* **1**, 61–69.
- Westwood JH.** 2013. The Physiology of the Established Parasite–Host Association. In: Joel DM, Gressel J, Musselman LJ, eds. *Parasitic Orobanchaceae*. Springer Berlin Heidelberg, 87–114.

- Westwood JH, Roney JK, Khatibi PA, Stromberg VK.** 2009. RNA translocation between parasitic plants and their hosts. *Pest Management Science* **65**, 533–539.
- Westwood JH, Yoder JI, Timko MP, dePamphilis CW.** 2010. The evolution of parasitism in plants. *Trends in Plant Science* **15**, 227–235.
- Whitney SM, Houtz RL, Alonso H.** 2010. Advancing Our Understanding and Capacity to Engineer Nature's CO₂-Sequestering Enzyme, Rubisco. *PLANT PHYSIOLOGY* **155**, 27–35.
- Widiez T, El Kafafi ES, Girin T, Berr A, Ruffel S, Krouk G, Vayssieres A, Shen W-H, Coruzzi GM, Gojon A, et al.** 2011. HIGH NITROGEN INSENSITIVE 9 (HNI9)-mediated systemic repression of root NO₃⁻ uptake is associated with changes in histone methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 13329–13334.
- Wigchert SCM, Kuiper E, Boelhouwer GJ, Nefkens GHL, Verkleij JAC, Zwanenburg B.** 1999. Dose-Response of Seeds of the Parasitic Weeds *Striga* and *Orobancha* toward the Synthetic Germination Stimulants GR 24 and Nijmegen 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 1705–1710.
- Wilkinson JQ, Crawford NM.** 1993. Identification and characterization of a chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes NIA1 and NIA2. *Molecular and General Genetics MGG* **239**, 289–297.
- Williams LE, Miller AJ.** 2001. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. *Annual review of plant biology* **52**, 659–688.
- Wingler A.** 2005. The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **57**, 391–399.
- Wingler A, Masclaux-Daubresse C, Fischer AM.** 2009. Sugars, senescence, and ageing in plants and heterotrophic organisms. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1063–1066.
- Wingler A, Roitsch T.** 2008. Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. *Plant Biology* **10**, 50–62.
- Wirth J, Chopin F, Santoni V, Viennois G, Tillard P, Krapp A, Lejay L, Daniel-Vedele F, Gojon A.** 2007. Regulation of Root Nitrate Uptake at the NRT2.1 Protein Level in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 23541–23552.
- Witte C-P.** 2011. Urea metabolism in plants. *Plant Science* **180**, 431–438.
- Wolfe AD, Randle CP, Liu L, Steiner KE.** 2005. Phylogeny and biogeography of *Orobanchaceae*. *Folia Geobotanica* **40**, 115–134.
- Xie X, Kusumoto D, Takeuchi Y, Yoneyama K, Yamada Y, Yoneyama K.** 2007. 2'-Epi-orobanchol and Solanacol, Two Unique Strigolactones, Germination Stimulants for Root Parasitic Weeds, Produced by Tobacco. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 8067–8072.
- Xie X, Yoneyama K, Harada Y, Fusegi N, Yamada Y, Ito S, Yokota T, Takeuchi Y, Yoneyama K.** 2009a. Fabacyl acetate, a germination stimulant for root parasitic plants from *Pisum sativum*. *Phytochemistry* **70**, 211–215.

- Xie X, Yoneyama K, Kurita J, Harada Y, Yamada Y, Takeuchi Y, Yoneyama K.** 2009b. 7-Oxo-orobanchyl Acetate and 7-Oxo-orobanchol as Germination Stimulants for Root Parasitic Plants from Flax (*Linum usitatissimum*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **73**, 1367–1370.
- Xie X, Yoneyama K, Kusumoto D, Yamada Y, Takeuchi Y, Sugimoto Y, Yoneyama K.** 2008a. Sorgomol, germination stimulant for root parasitic plants, produced by *Sorghum bicolor*. *Tetrahedron Letters* **49**, 2066–2068.
- Xie X, Yoneyama K, Kusumoto D, Yamada Y, Yokota T, Takeuchi Y, Yoneyama K.** 2008b. Isolation and identification of alectrol as (+)-orobanchyl acetate, a germination stimulant for root parasitic plants. *Phytochemistry* **69**, 427–431.
- Xie X, Yoneyama K, Yoneyama K.** 2010. The strigolactone story. *Phytopathology* **48**, 93.
- Xu G, Fan X, Miller AJ.** 2012. Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. *Annual Review of Plant Biology* **63**, 153–182.
- Yoder JI.** 2001. Host-plant recognition by parasitic *Scrophulariaceae*. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 359–365.
- Yokota T, Sakai H, Okuno K, Yoneyama K, Takeuchi Y.** 1998. Alectrol and orobanchol, germination stimulants for *Orobanche minor*, from its host red clover. *Phytochemistry* **49**, 1967–1973.
- Yoneyama K, Awad AA, Xie X, Yoneyama K, Takeuchi Y.** 2010. Strigolactones as germination stimulants for root parasitic plants. *Plant and Cell Physiology* **51**, 1095.
- Yoneyama K, Takeuchi Y, Yokota T.** 2001. Production of clover broomrape seed germination stimulants by red clover root requires nitrate but is inhibited by phosphate and ammonium. *Physiologia Plantarum* **112**, 25–30.
- Yoneyama K, Xie X, Kim HI, Kisugi T, Nomura T, Sekimoto H, Yokota T, Yoneyama K.** 2012. How do nitrogen and phosphorus deficiencies affect strigolactone production and exudation? *Planta* **235**, 1197–1207.
- Yoneyama K, Xie X, Kisugi T, Nomura T, Sekimoto H, Yokota T, Yoneyama K.** 2011. Characterization of strigolactones exuded by *Asteraceae* plants. *Plant Growth Regulation* **65**, 495–504.
- Yoneyama K, Xie X, Kusumoto D, Sekimoto H, Sugimoto Y, Takeuchi Y, Yoneyama K.** 2007a. Nitrogen deficiency as well as phosphorus deficiency in sorghum promotes the production and exudation of 5-deoxystrigol, the host recognition signal for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasites. *Planta* **227**, 125–132.
- Yoneyama K, Xie X, Yoneyama K, Takeuchi Y.** 2009. Strigolactones: structures and biological activities. *Pest Management Science* **65**, 467–470.
- Yoneyama K, Yoneyama K, Takeuchi Y, Sekimoto H.** 2007b. Phosphorus deficiency in red clover promotes exudation of orobanchol, the signal for mycorrhizal symbionts and germination stimulant for root parasites. *Planta* **225**, 1031–1038.

- Yoshida S.** 2003. Molecular regulation of leaf senescence. *Current opinion in plant biology* **6**, 79–84.
- Young ND, Steiner KE, dePamphilis CW.** 1999. The Evolution of Parasitism in *Scrophulariaceae/Orobanchaceae*: Plastid Gene Sequences Refute an Evolutionary Transition Series. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **86**, 876–893.
- Yuan L, Loque D, Kojima S, Rauch S, Ishiyama K, Inoue E, Takahashi H, von Wieren N.** 2007. The Organization of High-Affinity Ammonium Uptake in *Arabidopsis* Roots Depends on the Spatial Arrangement and Biochemical Properties of AMT1-Type Transporters. *THE PLANT CELL ONLINE* **19**, 2636–2652.
- Zeeman SC, Kossmann J, Smith AM.** 2010. Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 209–234.
- Zehhar N, Ingouff M, Bouya D, Fer A.** 2002. Possible involvement of gibberellins and ethylene in *Orobanche ramosa* germination. *Weed Research* **42**, 464–469.
- Zehhar N, Labrousse P, Arnaud MC, Boulet C, Bouya D, Fer A.** 2003. Study of resistance to *Orobanche ramosa* in host (oilseed rape and carrot) and non-host (maize) plants. *European journal of plant pathology* **109**, 75–82.
- Zélicourt A, Letousey P, Thoiron S, Campion C, Simoneau P, Elmorjani K, Marion D, Simier P, Delavault P.** 2007. Ha-DEF1, a sunflower defensin, induces cell death in *Orobanche* parasitic plants. *Planta* **226**, 591–600.
- Zhang H, Forde BG.** 2000. Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *Journal of Experimental Botany* **51**, 51–59.
- Zhang H, Jennings A, Barlow PW, Forde BG.** 1999. Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 6529–6534.
- Zhang FS, Ma J, Cao YP.** 1997. Phosphorus deficiency enhances root exudation of low-molecular weight organic acids and utilization of sparingly soluble inorganic phosphates by radish (*Raghanus sativus* L.) and rape (*Brassica napus* L.) plants (T Ando, K Fujita, T Mae, H Matsumoto, S Mori, and J Sekiya, Eds.). *Plant Nutrition for Sustainable Food Production and Environment*, 301–304.
- Zhang H, Rong H, Pilbeam D.** 2007. Signalling mechanisms underlying the morphological responses of the root system to nitrogen in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2329–2338.
- Zhang J, Sun X, Zhang Z, Ni Y, Zhang Q, Liang X, Xiao H, Chen J, Tokuhisa JG.** 2011. Metabolite profiling of *Arabidopsis* seedlings in response to exogenous sinalbin and sulfur deficiency. *Phytochemistry* **72**, 1767–1778.
- Zhang L, Tan Q, Lee R, Trethewy A, Lee Y-H, Tegeder M.** 2010. Altered Xylem-Phloem Transfer of Amino Acids Affects Metabolism and Leads to Increased Seed Yield and Oil Content in *Arabidopsis*. *THE PLANT CELL ONLINE* **22**, 3603–3620.
- Zhao M, Ding H, Zhu J-K, Zhang F, Li W-X.** 2011. Involvement of miR169 in the nitrogen-starvation responses in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **190**, 906–915.

Zhao FJ, Evans EJ, Bilsborrow PE, Syers JK. 1993. Sulphur uptake and distribution in double and single low varieties of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant and Soil* **150**, 69–76.

Zhao M, Tai H, Sun S, Zhang F, Xu Y, Li W-X. 2012. Cloning and Characterization of Maize miRNAs Involved in Responses to Nitrogen Deficiency (S Pfeffer, Ed.). *PLoS ONE* **7**, e29669.

Zheng D, Han X, An Y, Guo H, Xia X, Yin W. 2013. The nitrate transporter NRT2.1 functions in the ethylene response to nitrate deficiency in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* **36**, 1328–1337.

Zhou WJ. 2004. In vitro infection of host roots by differentiated calli of the parasitic plant *Orobancha*. *Journal of Experimental Botany* **55**, 899–907.

Zimmermann P, Zentgraf U. 2005. The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular & molecular biology letters* **10**, 515–534.

Ben Zioni A, Vaadia Y, Lips SH. 1971. Nitrate Uptake by Roots as Regulated by Nitrate Reduction Products of the Shoot. *Physiologia Plantarum* **24**, 288–290.

Zwanenburg B, Mwakaboko AS, Reizelman A, Anilkumar G, Sethumadhavan D. 2009. Structure and function of natural and synthetic signalling molecules in parasitic weed germination. *Pest Management Science* **65**, 478–491.

Zwanenburg B, Pospíšil T. 2013. Structure and Activity of Strigolactones: New Plant Hormones with a Rich Future. *Molecular Plant* **6**, 38–62.

Sitographie

AZOTE : <http://www.azote.info>

BASF : <http://www.agro.basf.fr>

BAYER : <http://www.bayer-agri.fr>

CETIOM : <http://www.cetiom.fr>

CETIPA : <http://www.cetipa.org/fr>

Ministère du Développement durable : <http://www.developpement-durable.gouv.fr>

SYNGENTA : <http://www3.syngenta.com>

Annexes

Tableau I : Spectres d'hôtes des principales espèces d'orobanches phytopathogènes de grandes cultures ; XXX : infestation sérieuse, XX : infestation moyenne, X : faible infestation. (Musselman, 1980; Linke *et al.*, 1989; Press and Graves, 1995; Rubiales *et al.*, 2005; Joel *et al.*, 2007; Abbes *et al.*, 2008)

Nom latin	Nom français	<i>O. cumana</i>	<i>O. cernua</i>	<i>O. crenata</i>	<i>O. minor</i>	<i>O. foetida</i>	<i>P. ramosa</i>	<i>P. aegyptiaca</i>
APIACEAE								
<i>Apium</i> spp.	Céleri			X	X		X	X
<i>Daucus carota</i> L.	Carotte			XX	X		X	X
<i>Pastinaca sativa</i> L.	Panais						X	X
ASTERACEAE								
<i>Carthamus</i> spp.	Carthame			X	X		XX	XX
<i>Helianthus annuus</i> L.	Tournesol	XXX	X	X	X		XX	XX
<i>Lactuca</i> spp.	Laitue			X	X		X	X
BRASSICACEAE								
<i>Brassica</i> spp.	Colza, Moutarde...						XXX	XX
CANNABINACEAE								
<i>Cannabis sativa</i> L.	Chanvre						X	XX
CUCURBITACEAE								
<i>Cucumis</i> spp.	Melon, Concombre...			X			XX	XX
<i>Cucurbita</i> spp.	Courges						XX	XX
<i>Citrullus lanatus</i> (T.) M. N.	Pastèque							XX
FABACEAE								
<i>Arachis hypogaea</i> L.	Arachide			X	X		X	X
<i>Cicer arietinum</i> L.	Pois chiche			XX		XX	X	X
<i>Lens culinaris</i> Medik.	Lentille			XX	X	X	X	X
<i>Lotus</i> spp.	Lotier				X	X		
<i>Medicago sativa</i> L.	Luzerne				X	XX		
<i>Pisum sativum</i> L.	Pois			XX			X	X
<i>Trifolium</i> spp.	Trèfle				XXX	XX	X	X
<i>Vicia faba</i> L.	Fève			XXX	X	XXX	X	X
<i>Vicia sativa</i> L.	Vesce			X		XXX	X	X
MALVACEAE								
<i>Gossypium</i> spp.	Cotonnier						X	
SOLANACEAE								
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Tabac	X	XXX		X		XXX	XXX
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Tomate	X	XX	X			XXX	XXX
<i>Solanum melongena</i> L.	Aubergine	X	XX				XXX	XXX
<i>Solanum tuberosum</i> L.	Pomme de terre		X				XX	XX

Tableau II : Évolution du profil des aminoacides libres dans différents compartiments de colza (variété sensible ES Alienor). Cultures en serre alimentées en K¹⁵NO₃ (2,5 mM, enrichi à 98 %, 300 mL) en sortie de vernalisation (temps 0 jpp), puis fertilisées deux fois par semaine avec 300 mL de LiquoplantTM FD 134 Hiver 3 ‰. Les teneurs en aminoacides libres sont exprimées en µmol g⁻¹ MS (n = 6, moyennes ± SE). jpp, jours post-pulse.

	Racines			Hypocotyle			Tige			Feuilles			Siliques			
	3 jpp	30 jpp	3 jpp	15 jpp	30 jpp	3 jpp	15 jpp	30 jpp	3 jpp	15 jpp	30 jpp	15 jpp	30 jpp	15 jpp	30 jpp	
	15 jpp	30 jpp	3 jpp	15 jpp	30 jpp	3 jpp	15 jpp	30 jpp	15 jpp	30 jpp	3 jpp	15 jpp	30 jpp	15 jpp	30 jpp	
SMCSO	5,49 ± 0,40	5,15 ± 0,18	2,05 ± 0,38	9,48 ± 0,44	7,36 ± 0,32	3,29 ± 0,61	21,84 ± 1,34	20,36 ± 0,73	9,56 ± 1,15	5,54 ± 0,26	11,94 ± 1,68	17,39 ± 1,90	31,23 ± 2,61	20,68 ± 1,55	31,23 ± 2,61	20,68 ± 1,55
Glutamate	1,98 ± 0,12	2,81 ± 0,20	2,31 ± 0,18	2,71 ± 0,21	3,23 ± 0,20	2,73 ± 0,33	4,97 ± 0,51	5,04 ± 0,22	3,63 ± 0,41	4,45 ± 0,16	7,13 ± 0,43	6,76 ± 0,97	7,83 ± 1,23	10,55 ± 1,15	7,83 ± 1,23	10,55 ± 1,15
Glutamine	1,80 ± 0,17	4,62 ± 1,17	1,26 ± 0,12	3,18 ± 0,16	3,97 ± 0,25	1,64 ± 0,23	9,36 ± 0,67	20,93 ± 1,26	3,20 ± 0,51	1,72 ± 0,33	4,35 ± 0,92	8,78 ± 1,53	82,97 ± 6,15	48,87 ± 4,22	8,78 ± 1,53	48,87 ± 4,22
Aspartate	1,07 ± 0,08	1,38 ± 0,10	1,15 ± 0,09	1,71 ± 0,17	2,44 ± 0,13	1,76 ± 0,14	3,64 ± 0,37	3,97 ± 0,19	3,17 ± 0,28	1,85 ± 0,14	4,22 ± 0,36	4,03 ± 0,51	8,45 ± 0,67	6,57 ± 0,71	4,03 ± 0,51	8,45 ± 0,67
Asparagine	0,61 ± 0,05	0,81 ± 0,11	0,35 ± 0,04	0,72 ± 0,05	0,93 ± 0,06	0,40 ± 0,06	1,33 ± 0,12	3,38 ± 0,19	0,67 ± 0,11	0,26 ± 0,05	1,19 ± 0,21	3,11 ± 0,62	10,84 ± 1,30	5,24 ± 0,64	3,11 ± 0,62	10,84 ± 1,30
Proline	0,81 ± 0,15	1,58 ± 0,38	0,91 ± 0,14	2,09 ± 0,44	5,94 ± 1,10	1,12 ± 0,44	9,30 ± 1,34	16,46 ± 1,80	1,92 ± 0,95	2,59 ± 0,49	1,85 ± 0,20	1,22 ± 0,44	25,59 ± 7,12	5,22 ± 2,34	1,22 ± 0,44	25,59 ± 7,12
GABA	1,63 ± 0,15	1,80 ± 0,12	1,33 ± 0,17	1,40 ± 0,04	1,78 ± 0,22	0,90 ± 0,17	5,11 ± 0,79	3,16 ± 0,18	1,68 ± 0,15	0,85 ± 0,05	1,65 ± 0,14	1,25 ± 0,15	17,04 ± 2,16	7,75 ± 1,02	1,25 ± 0,15	17,04 ± 2,16
Serine	0,75 ± 0,05	0,89 ± 0,08	0,28 ± 0,04	1,05 ± 0,06	1,19 ± 0,10	0,59 ± 0,09	2,97 ± 0,25	2,62 ± 0,12	1,90 ± 0,22	1,41 ± 0,15	2,06 ± 0,13	2,30 ± 0,16	16,62 ± 3,04	11,16 ± 2,28	2,30 ± 0,16	16,62 ± 3,04
Alpha-Alanine	0,91 ± 0,15	0,96 ± 0,18	0,62 ± 0,10	0,69 ± 0,08	0,57 ± 0,04	0,51 ± 0,06	3,35 ± 0,58	2,23 ± 0,22	1,09 ± 0,12	1,38 ± 0,04	2,63 ± 0,15	2,80 ± 0,31	11,93 ± 2,65	4,46 ± 0,45	2,80 ± 0,31	11,93 ± 2,65
Threonine	0,89 ± 0,08	1,30 ± 0,13	0,60 ± 0,07	1,11 ± 0,11	1,39 ± 0,06	0,76 ± 0,09	2,39 ± 0,17	2,09 ± 0,11	1,66 ± 0,21	0,65 ± 0,06	2,42 ± 0,35	3,00 ± 0,26	7,16 ± 1,29	7,70 ± 0,97	3,00 ± 0,26	7,16 ± 1,29
Arginine	0,13 ± 0,03	0,18 ± 0,04	0,08 ± 0,02	0,42 ± 0,22	0,15 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,72 ± 0,17	1,67 ± 0,14	0,87 ± 0,23	0,17 ± 0,02	0,40 ± 0,02	1,01 ± 0,17	16,38 ± 5,68	8,70 ± 0,83	1,01 ± 0,17	16,38 ± 5,68
Homoserine	1,09 ± 0,15	0,73 ± 0,06	0,75 ± 0,17	1,31 ± 0,03	0,98 ± 0,06	0,68 ± 0,06	3,35 ± 0,21	2,04 ± 0,14	1,34 ± 0,12	1,37 ± 0,09	1,93 ± 0,16	2,55 ± 0,23	5,85 ± 0,73	3,09 ± 0,33	2,55 ± 0,23	5,85 ± 0,73
Valine	0,91 ± 0,08	1,01 ± 0,10	0,47 ± 0,05	1,53 ± 0,10	1,34 ± 0,09	0,54 ± 0,08	1,86 ± 0,18	1,94 ± 0,13	0,81 ± 0,15	0,53 ± 0,06	1,15 ± 0,08	1,49 ± 0,17	8,53 ± 1,45	4,57 ± 0,44	1,49 ± 0,17	8,53 ± 1,45
Isoleucine	0,30 ± 0,02	0,47 ± 0,07	0,18 ± 0,03	0,62 ± 0,03	0,84 ± 0,05	0,26 ± 0,05	1,22 ± 0,09	1,11 ± 0,07	0,39 ± 0,07	0,22 ± 0,05	0,60 ± 0,06	0,78 ± 0,11	4,50 ± 0,84	1,86 ± 0,19	0,78 ± 0,11	4,50 ± 0,84
Leucine	0,36 ± 0,03	0,38 ± 0,04	0,14 ± 0,02	0,37 ± 0,01	0,33 ± 0,04	0,13 ± 0,03	0,86 ± 0,17	0,70 ± 0,04	0,25 ± 0,03	0,28 ± 0,07	0,66 ± 0,07	0,79 ± 0,10	5,07 ± 1,24	1,31 ± 0,19	0,79 ± 0,10	5,07 ± 1,24
Hyistidine	0,13 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,25 ± 0,03	0,26 ± 0,02	0,15 ± 0,03	0,79 ± 0,08	0,84 ± 0,06	0,27 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,32 ± 0,04	0,79 ± 0,11	5,13 ± 1,19	1,76 ± 0,13	0,79 ± 0,11	5,13 ± 1,19
Lysine	0,14 ± 0,01	0,17 ± 0,03	0,11 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,87 ± 0,16	0,71 ± 0,03	0,29 ± 0,04	0,25 ± 0,03	0,56 ± 0,04	0,70 ± 0,07	4,35 ± 0,91	1,28 ± 0,15	0,70 ± 0,07	4,35 ± 0,91
Glycine	0,32 ± 0,06	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,33 ± 0,04	0,09 ± 0,01	0,05 ± 0,00	1,12 ± 0,18	0,38 ± 0,06	0,11 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,24 ± 0,03	0,56 ± 0,10	3,18 ± 0,57	1,33 ± 0,28	0,56 ± 0,10	3,18 ± 0,57
PhenylAlanine	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,22 ± 0,04	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,48 ± 0,07	0,41 ± 0,02	0,29 ± 0,03	0,25 ± 0,05	0,57 ± 0,09	1,10 ± 0,16	2,49 ± 0,61	1,07 ± 0,12	1,10 ± 0,16	2,49 ± 0,61
Tyrosine	0,15 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,28 ± 0,07	0,16 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,37 ± 0,08	0,24 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,31 ± 0,04	0,49 ± 0,08	1,49 ± 0,31	0,51 ± 0,05	0,49 ± 0,08	1,49 ± 0,31
SMC	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,10 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,18 ± 0,03	0,71 ± 0,14	1,11 ± 0,10	0,86 ± 0,08	0,71 ± 0,14	1,11 ± 0,10
Tryptophane	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,03	0,10 ± 0,03	0,24 ± 0,04	0,21 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,35 ± 0,04	0,93 ± 0,19	0,27 ± 0,03	0,35 ± 0,04	0,93 ± 0,19
Methionine	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,27 ± 0,04	0,12 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,23 ± 0,03	1,28 ± 0,32	0,30 ± 0,05	0,23 ± 0,03	1,28 ± 0,32
X _t	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,02	0,08 ± 0,03	0,47 ± 0,10	1,79 ± 0,29	0,04 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,47 ± 0,10	1,79 ± 0,29
Beta-Alanine	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,32 ± 0,06	0,25 ± 0,04	0,15 ± 0,02	0,32 ± 0,06	0,25 ± 0,04
Cystine	0,04 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,03	0,09 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,03
Ornithine	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,25 ± 0,07	0,07 ± 0,02	0,04 ± 0,00	0,25 ± 0,07
Hydroxyproline	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,19 ± 0,05	0,04 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,19 ± 0,05

Tableau III : UPLC-PDA-ESI-MS parameters for the determination of AccQ•Tag amino acids derivatives ((M + H)⁺ adducts) using PDA coupled with Selected Ion Recording (SIR). (SIR, n = 440; PDA, n = 550; * corresponding data differ significantly at *P* < 0.05 Tukey's test). FW, formula weight; Cone V, cone voltage; Rt, retention time; SD, standard deviation; CV, coefficient of variation for retention time.

Compounds	FW	Observed ion (m/z)	Time Window (min)	Cone V (V)	SIR mode				PDA			
					Rt (min)	SD	CV (%)	Rt (min)	SD	CV (%)	Rt (min)	SD
Ammonium	17.03	188	1.40 - 1.90	27	1.66*	0.01	0.88%	1.63	0.01	0.85%		
Ammonium- ¹⁵ N	18.03	189			1.65*	0.01	0.75%	1.63	0.01	0.86%		
L-Asparagine	132.12	303.1	2.05 - 2.45	30	2.26	0.02	1.04%	2.23	0.02	1.08%		
L-Asparagine- ¹⁵ N ₂	134.1	305.1			2.26	0.02	1.02%	2.23	0.02	1.10%		
L-Glutamine	146.14	317.1	2.95 - 3.35	29	3.17	0.03	0.86%	3.14	0.02	0.76%		
L-Glutamine- ¹⁵ N ₂	148.13	319.1			3.17	0.02	0.76%	3.14	0.02	0.77%		
L-Arginine	174.2	345.2	3.10 - 3.50	27	3.30	0.03	0.77%	3.27	0.02	0.65%		
L-Arginine- ¹⁵ N ₄	178.18	349.2			3.30	0.03	0.84%	3.27	0.02	0.67%		
L-Aspartic acid	133.1	304.1	3.60 - 4.00	29	3.81*	0.02	0.65%	3.78	0.02	0.62%		
L-Aspartic acid- ¹⁵ N	134.1	305.1			3.80*	0.02	0.61%	3.77	0.02	0.64%		
L-Glutamic acid	147.1	318.1	4.20 - 4.60	28	4.42	0.02	0.43%	4.39	0.02	0.44%		
L-Glutamic acid- ¹⁵ N	148.12	319.1			4.42	0.02	0.43%	4.39	0.02	0.45%		
L-Proline	115.1	286.1	5.90 - 6.30	25	6.10*	0.02	0.38%	6.05	0.01	0.17%		
L-Proline- ¹⁵ N	116.12	287.1			6.09*	0.02	0.28%	6.05	0.01	0.17%		
β-Aminobutyric acid	103.12	274.1	5.70 - 6.10	28	5.89	0.01	0.11%	5.87	0.01	0.19%		

Liste des tableaux

TABLEAU 1.1 : MILIEU DE CULTURE TADANO-TANAKA (TT) DILUE AU DEMI (PH = 6, NAOH 1MM).....	140
TABLEAU 1.2 : MODIFICATIONS DES MACROELEMENTS DU MILIEU DE CULTURE TT APPLIQUEES POUR LES DIFFERENTS REGIMES DE FERTILISATION	140
TABLEAU 1.3 : GRADIENT DE FRACTIONNEMENT RP-HPLC.....	144
TABLEAU 1.4 : FRACTIONS OBTENUES PAR RP-HPLC.....	144
TABLE 1.5 : LINEAR RELATIONSHIP BETWEEN MTT REDUCTION AND SEED GERMINATION RATE FOR VARIOUS PARASITIC PLANTS.	158
TABLE 1.6: ACTIVITY OF DIFFERENT STRIGOLACTONES ON <i>P. RAMOSA</i> SEED GERMINATION.	160
TABLE 1.7 : GR24 ACTIVITY ON SEED GERMINATION IN VARIOUS PARASITIC PLANTS.....	160
TABLE 1.8: ANTAGONISTIC ROLE OF ABA VERSUS GR24 ACTIVITIES ON SEED GERMINATION IN <i>P. RAMOSA</i>	162
TABLE 1.9 : ADVANTAGES AND DISADVANTAGES OF GERMINATION DETERMINATION METHODS.	164
TABLEAU 2.1 : COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE LIQUOPLANT BLEU ET FD 134 HIVER	196
TABLEAU 3.1 : LIMITS OF DETECTION (LOD) AND LOW LIMITS OF LINEARITY (LOQ) FOR AccQ.TAG AMINO ACID DERIVATIVE STANDARDS USING SELECTED ION RECORDING (SIR).	264
TABLE 3.2 : LINEAR FIT DATA BETWEEN LABELED AND UNLABELED AMINO ACID RATIO AND CALIBRATION CURVES OF LABELED AND UNLABELED AMINO ACIDS.....	266
TABLE 3.3 : LINEAR FIT DATA BETWEEN ISOTOPICALLY LABELED AMINO ACID CALIBRATION CURVES WITHIN A MIX OF UNLABELED AMINO ACIDS AND/OR BIOLOGICAL MATRIX.....	267
TABLE 3.4 : PEAK AREA REPRODUCIBILITY FOR AccQ.TAG AMINO ACID DERIVATIVES FROM BIOLOGICAL SAMPLES ANALYZED BY UPLC-ESI-MS.....	268
TABLEAU 3.5 : LINEAR FIT DATA BETWEEN AREAS QUANTITATED BY PDA DETECTOR AND SIR MODE, FROM UNLABELED, LABELED AND MIX OF BOTH STANDARD CURVES.....	268
TABLEAU 3.6 : COMPARISON BETWEEN ¹⁵ N ISOTOPOLOGUE ENRICHMENTS CALCULATED WITH SIR MODE DATA AND PDA DETECTOR DATA FOR THE TOTAL AMINO ACID AMOUNT (EQUATION 3), IN A LABELED SAMPLE COMPARED TO A CONTROL SAMPLE	270

Liste des figures

FIGURE 1 : INTERACTION <i>BRASSICA NAPUS</i> / <i>PHELIPANCHE RAMOSA</i>	2
FIGURE 2 : DIVERSITE DES ANGIOSPERMES PARASITES	8
FIGURE 3 : ILLUSTRATION CLASSIQUE DES DIFFERENTS TYPES D'ANGIOSPERMES PARASITES.....	8
FIGURE 4 : DISTRIBUTION DE L'OROBANCHE RAMEUSE AUTOUR DU GLOBE	14
FIGURE 5 : CYCLE BIOLOGIQUE DE L'OROBANCHE RAMEUSE	14
FIGURE 6 : GRAINE D'OROBANCHE RAMEUSE	16
FIGURE 7 : STRUCTURE DES PRINCIPALES STRIGOLACTONES D'ORIGINE NATURELLE ET D'UN ANALOGUE SYNTHETIQUE	18
FIGURE 8 : SCHEMA RECAPITULATIF DU PROCESSUS DE GERMINATION DE <i>P. RAMOSA</i>	20
FIGURE 9 : STADES PRECOSES DE DEVELOPPEMENT DE L'OROBANCHE RAMEUSE	22
FIGURE 10 : MECANISMES D'INITIATION HAUSTORIALE CHEZ <i>TRIPHYSARIA</i> ET <i>STRIGA</i>	22
FIGURE 11 : ARRÊT DE L'INITIATION HAUSTORIALE CHEZ <i>STRIGA</i> SPP	22
FIGURE 12 : INITIATION HAUSTORIALE ET DEVELOPPEMENT DES PAPILLES CHEZ <i>O. CUMANA</i>	24
FIGURE 13 : CONNEXIONS VASCULAIRES CHEZ <i>STRIGA HERMONTHICA</i>	24
FIGURE 14 : CONNEXIONS VASCULAIRES CHEZ LES OROBANCHES.....	26
FIGURE 15 : CONTINUUM VASCULAIRE ENTRE L'OROBANCHE ET SON HOTE.....	26
FIGURE 16 : VOIES D'ACCES POTENTIELLES DU PARASITE AUX SOLUTES DE L'HOTE	28
FIGURE 17 : RELATIONS SOURCES/PUITS AU SEIN D'UNE INTERACTION PLANTE HOTE – OROBANCHE	30
FIGURE 18 : MODELE THEORIQUE DE LA DECHARGE, DU TRANSPORT ET DU METABOLISME DU SACCHAROSE CHEZ <i>P. RAMOSA</i>	30
FIGURE 19 : MECANISMES DE RESISTANCES A L'OROBANCHE	36-38
FIGURE 20 : LARVE DE <i>SMICRONYX CYANEUS</i> DANS UNE TIGE D' <i>OROBANCHE TEUCRII</i>	46
FIGURE 21 : LE TRIANGLE DE U	50
FIGURE 22 : ÉVOLUTION DE LA CULTURE DU COLZA EN FRANCE ENTRE 1961 ET 2011	50
FIGURE 23 : PRINCIPAUX PAYS PRODUCTEURS DE COLZA EN 2011	52
FIGURE 24 : PRINCIPALES MALADIES D'ORIGINE FONGIQUE DU COLZA	54
FIGURE 25 : PRINCIPAUX RAVAGEURS INSECTES DU COLZA	56
FIGURE 26 : QUELQUES ADVENTICES FREQUENTES DE LA CULTURE DE COLZA	58
FIGURE 27 : STADES PHENOLOGIQUES DU COLZA D'HIVER SELON JUNG	60
FIGURE 28 : CARTE DE REPARTITION DES SURFACES CULTIVEES DE COLZA PAR DEPARTEMENT EN 2011	62
FIGURE 29 : CYCLE DE L'AZOTE PAR LES MICROORGANISMES DU SOL	66
FIGURE 30 : VOIES D'ABSORPTION DES IONS AU SEIN D'UNE RACINE	68
FIGURE 31 : SYSTEME D'ABSORPTION RACINAIRE DU NITRATE	68
FIGURE 32 : CINETIQUES D'ABSORPTION DU NITRATE PAR LES COMPOSANTES CONSTITUTIVES (C) ET INDUCTIBLES (I) DES SYSTEMES DE TRANSPORT HATS ET LATS CHEZ <i>BRASSICA NAPUS</i>	70
FIGURE 33 : IMPLICATION DES DIFFERENTS TRANSPORTEURS DE NITRATE DANS L'ABSORPTION ET LA TRANSLOCATION RACINAIRE.....	70
FIGURE 34 : MODELE D'ABSORPTION ET DE TRANSLOCATION DES AMINOACIDES DANS UNE RACINE NON-MYCORHIZEE DE PLANTE	74
FIGURE 35 : REACTIONS ENZYMATIQUES CATALYSEES PAR LA NITRATE REDUCTASE ET LA NITRITE REDUCTASE	86
FIGURE 36 : BILAN DES FLUX D'AZOTE CHEZ LE COLZA	102
FIGURE 37 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PRINCIPAUX ENZYMES IMPLIQUES DANS LE METABOLISME AZOTE PRIMAIRE AU SEIN D'UNE JEUNE FEUILLE (A) ET D'UNE FEUILLE SENESCENTE (B).....	106
FIGURE 38 : RECENSEMENT DES PARCELLES INFESTEES PAR L'OROBANCHE RAMEUSE EN FRANCE	116
FIGURE 39 : DIFFERENCES MORPHOLOGIQUES OBSERVEES ENTRE LES TUBERCULES DE <i>P. RAMOSA</i> FIXES SUR LE GENOTYPE GRIZZLY (PHENOTYPE NORMAL) ET SHAKIRA (PHENOTYPE PERTURBE : GROS TUBERCULE, TIGE GRELE).....	118
FIGURE 40 : CYCLE BIOLOGIQUE DE L'OROBANCHE RAMEUSE HAUTEMENT SYNCHRONISE A CELUI DU COLZA.....	120

FIGURE 1.1 : CULTURE DU COLZA EN HYDROPONIE.....	142
FIGURE 1.2 : CO-CULTURE DE L'ASSOCIATION COLZA – OROBANCHE RAMEUSE EN MINI-RHIZOTRON.....	142
FIGURE 1.3: REDUCTION OF MTT BY CONDITIONED AND GERMINATED SEEDS OF <i>P. RAMOSA</i>	150
FIGURE 1.4 : EXPERIMENTAL DESIGN FOR THE PROPOSED HIGH-THROUGHPUT SEED GERMINATION ASSAY FOR ROOT PARASITIC PLANTS.	152
FIGURE 1.5 : PH IMPACT ON SEED GERMINATION AND RADICLE GROWTH IN <i>PHELIPANCHE RAMOSA</i>	154
FIGURE 1.6 : KINETICS OF SEED GERMINATION AND RADICLE GROWTH IN <i>PHELIPANCHE RAMOSA</i>	154
ADDITIONAL FILE 1. TIME COURSE OF MTT REDUCTION BY <i>P. RAMOSA</i> GERMINATED SEEDS	156
ADDITIONAL FILE 2. FORMAZAN SALT SOLUBILIZATION	156
FIGURE 1.7 : LINEAR RELATIONSHIP BETWEEN MTT REDUCTION AND GERMINATION RATE FOR <i>P. RAMOSA</i> SEEDS	158
FIGURE 1.8: ACTIVITIES OF STRIGOLACTONES ON <i>P. RAMOSA</i> SEED GERMINATION	160
FIGURE 1.9 : ROOT EXUDATES ACTIVITY OF TWO BRASSICA NAPUS ELITE LINES ON <i>P. RAMOSA</i> SEED GERMINATION.	162
FIGURE 1.10: IMPACT DE DIFFERENTS REGIMES DE FERTILISATION SUR LA BIOMASSE DES DIFFERENTS COMPARTIMENTS DE L'INTERACTION.....	172
FIGURE 1.11 : IMPACT DE DIFFERENTS REGIMES DE FERTILISATION SUR LA CAPACITE DU COLZA A INDIURE LA GERMINATION DES GRAINES D'OROBANCHE	172
FIGURE 1.12 : DE DIFFERENTS REGIMES DE FERTILISATION SUR LA SENSIBILITE DU COLZA A L'OROBANCHE RAMEUSE.	174
FIGURE 1.13 : IMPACT DES DIFFERENTES CARENCES SUR LES TENEURS EN CARBONE, AZOTE ET SOUFRE, ET SUR LE RATIO N/C DU COLZA INFESTE PAR L'OROBANCHE RAMEUSE	174
FIGURE 1.14 : IMPACT DES DIFFERENTES CARENCES SUR LA TENEUR GLOBALE (A) ET LA COMPOSITION EN GLUCOSINOLATES (B1 ET B2) DES RACINES DU COLZA INFESTE PAR L'OROBANCHE RAMEUSE	176
FIGURE 1.15 : IMPACT DES DIFFERENTES CARENCES SUR LA CINETIQUE D'EXSUDATION DES PRODUITS DE DEGRADATION DE LA GLUCONASTURTIINE PAR LES RACINES DE COLZA	176
FIGURE 1.16 : IMPACT DES DIFFERENTES CARENCES SUR L'EXSUDATION DE PRODUITS DE DEGRADATION DE LA GLUCONASTURTIINE PAR LES RACINES DE COLZA	178
FIGURE 1.17 : IMPACT DES DIFFERENTES CARENCES SUR LA CAPACITE DES EXTRAITS D'EXSUDATS RACINAIRES DE COLZA FRACTIONNES PAR RP-HPLC A INDIURE LA GERMINATION DES GRAINES D'OROBANCHE RAMEUSE	178
FIGURE 2.1 : CO-CULTURE EN SERRE DE L'INTERACTION COLZA - OROBANCHE RAMEUSE ALIMENTEES EN $K^{15}NO_3$	198
FIGURE 2.2 : CINETIQUES D'ACCUMULATION DE BIOMASSE EN CONDITIONS DE NON-INFESTATION (A) ET D'INFESTATION PAR L'OROBANCHE RAMEUSE (B), CHEZ LE GENOTYPE DE COLZA SENSIBLE ES ALIENOR	208
FIGURE 2.3 : CINETIQUES D'ACCUMULATION DE BIOMASSE RACINAIRE (A) ET FOLIAIRE (FEUILLES + FEUILLES MORTES ; B), CHEZ LE GENOTYPE DE COLZA SENSIBLE ES ALIENOR EN CONDITIONS DE NON-INFESTATION ET D'INFESTATION PAR L'OROBANCHE RAMEUSE	208
FIGURE 2.4 : IMPACT DU PARASITISME SUR L'ACCUMULATION DE BIOMASSE DANS LES FEUILLES MORTES (A, GRAPHIQUE PRINCIPAL), SUR LEUR TENEUR EN AZOTE (A, GRAPHIQUE INTERIEUR), ET SUR LE POURCENTAGE DE LA BIOMASSE TOTALE DE COLZA ALLOUE AUX FEUILLES MORTES (B), CHEZ LE GENOTYPE DE COLZA SENSIBLE ES ALIENOR.	210
FIGURE 2.5 : CINETIQUES D'ACCUMULATION DE BIOMASSE AU SEIN DU COLZA SEUL (A) ET DE L'INTERACTION COLZA - OROBANCHE (B), GENOTYPE ES ALIENOR. CULTURES EN SERRE ALIMENTEES EN $K^{15}NO_3$	210
FIGURE 2.6 : CINETIQUES D'ACCUMULATION D'AZOTE TOTAL EN CONDITIONS DE NON-INFESTATION (A) ET D'INFESTATION PAR L'OROBANCHE RAMEUSE (B), CHEZ LE GENOTYPE DE COLZA SENSIBLE ES ALIENOR	211
FIGURE 2.7 : CINETIQUES D'ACCUMULATION DE L'AZOTE CHEZ LE GENOTYPE DE COLZA SENSIBLE ES ALIENOR EN CONDITIONS DE NON-INFESTATION ET DANS L'INTERACTION COLZA - OROBANCHE RAMEUSE.....	211
FIGURE 2.8 : CINETIQUES D'ACCUMULATION DU ^{15}N ABSORBE TOTAL (A) ET DU ^{15}N ABSORBE TOTAL PAR G DE MATIERE SECHE RACINAIRE (B), CHEZ LE COLZA NON-INFESTE (VAR. SENSIBLE ES ALIENOR) ET DANS L'INTERACTION COLZA - OROBANCHE RAMEUSE	212
FIGURE 2.9 : CINETIQUES D'ACCUMULATION DU ^{15}N EN CONDITIONS DE NON-INFESTATION (A) ET D'INFESTATION PAR L'OROBANCHE RAMEUSE (B), CHEZ LE GENOTYPE DE COLZA SENSIBLE ES ALIENOR.	212

FIGURE 2.10 : REMOBILISATION DU ¹⁵ N EN CONDITIONS DE NON-INFESTATION ET D'INFESTATION PAR L'OROBANCHE RAMEUSE, DURANT LES PERIODES CLEFS DU DEVELOPPEMENT DU GENOTYPE SENSIBLE DE COLZA ES ALIENOR	214
FIGURE 2.11 : CINETIQUES D'INFESTATION PAR L'OROBANCHE RAMEUSE DES GENOTYPES DE COLZA SENSIBLE ES ALIENOR ET PARTIELLEMENT RESISTANT SHAKIRA CULTIVES EN SERRE (A) ET AU CHAMP (B)	216
FIGURE 2.12 : ÉVOLUTION DU PUIITS PARASITAIRE (OROBANCHE RAMEUSE, BIOMASSE ET NOMBRE TOTAL D'OROBANCHES FIXEES) EN POST-VERNALISATION SUR LES VARIETES SENSIBLE ES ALIENOR ET PARTIELLEMENT RESISTANTE SHAKIRA .	216
FIGURE 2.13 : CINETIQUES D'ACCUMULATION DE BIOMASSE DE TIGE (A) ET FOLIAIRE (FEUILLES + FEUILLES MORTES ; B), CHEZ LE GENOTYPE DE COLZA PARTIELLEMENT RESISTANT SHAKIRA, EN CONDITIONS DE NON-INFESTATION ET D'INFESTATION PAR L'OROBANCHE RAMEUSE.	218
FIGURE 2.14 : FLUX DE ¹⁵ N (µG JOUR-1) A PARTIR DU COMPARTIMENT FOLIAIRE DE COLZA ET VERS L'OROBANCHE RAMEUSE CHEZ LES GENOTYPES SENSIBLE ES ALIENOR (A) ET PARTIELLEMENT RESISTANT SHAKIRA (B)	218
FIGURE 2.15 : IMPACT DE L'INFESTATION PAR L'OROBANCHE RAMEUSE SUR LE DEVELOPPEMENT DU COLZA A 70 JPP. VAR. TRES SENSIBLE ES ALIENOR (A) ET VAR. PARTIELLEMENT RESISTANTE SHAKIRA (B) EN CONDITIONS D'INFESTATION (1) ET DE NON-INFESTATION (2)	220
FIGURE 3.1 : ÉVOLUTION DE LA TENEUR GLOBALE EN AMINOACIDES LIBRES DANS DIFFERENTS ORGANES DE COLZA (VARIETE SENSIBLE ES ALIENOR) EN CONDITIONS DE NON-INFESTATION (A) ET D'INFESTATION PAR L'OROBANCHE RAMEUSE (B)	240
FIGURE 3.2 : ÉVOLUTION DU PROFIL DES PRINCIPAUX AMINOACIDES LIBRES DANS DIFFERENTS ORGANES DE COLZA (VARIETE SENSIBLE ES ALIENOR) EN CONDITIONS DE NON-INFESTATION	242
FIGURE 3.3 : IMPACT DE L'INFESTATION PAR L'OROBANCHE RAMEUSE SUR LES POOLS D'AMINOACIDES LIBRES DES DIFFERENTS ORGANES DE COLZA (VARIETE SENSIBLE ES ALIENOR)	244
FIGURE 3.4 : TENEUR GLOBALE EN AMINOACIDES LIBRES DES EXUDATS PHLOEMIENS FOLIAIRES DE COLZA (VARIETE SENSIBLE ES ALIENOR) EN CONDITIONS DE NON-INFESTATION ET D'INFESTATION PAR L'OROBANCHE RAMEUSE.	244
FIGURE 3.5 : ÉVOLUTION DU PROFIL DES PRINCIPAUX AMINOACIDES LIBRES DANS LES EXUDATS PHLOEMIENS FOLIAIRES DE COLZA (VARIETE SENSIBLE ES ALIENOR) EN CONDITIONS DE NON-INFESTATION.	245
FIGURE 3.6 : IMPACT DE L'INFESTATION PAR L'OROBANCHE RAMEUSE SUR LES POOLS D'AMINOACIDES LIBRES DES EXUDATS PHLOEMIENS FOLIAIRES DE COLZA (VARIETE SENSIBLE ES ALIENOR)	246
FIGURE 3.7 : IMPACT DE L'INFESTATION PAR L'OROBANCHE RAMEUSE SUR LA TENEUR GLOBALE EN GLUCIDES, POLYOLS ET ACIDES ORGANIQUES DES EXUDATS PHLOEMIENS FOLIAIRES DE COLZA	246
FIGURE 3.8 : IMPACT DE L'INFESTATION PAR L'OROBANCHE RAMEUSE SUR LE PROFIL DES PRINCIPAUX GLUCIDES, POLYOLS ET ACIDES ORGANIQUES DES EXUDATS PHLOEMIENS FOLIAIRES DE COLZA (VARIETE SENSIBLE ES ALIENOR), A 3 JPP (A) ET 15 JPP (B).....	248
FIGURE 3.9 : COMPOSITION EN GLUCOSINOLATES DES EXUDATS PHLOEMIENS FOLIAIRES DE COLZA (VARIETE SENSIBLE ES ALIENOR) EN CONDITIONS D'INFESTATION PAR L'OROBANCHE RAMEUSE (A) ET DES TUBERCULES D'OROBANCHE RAMEUSE (B).....	248
FIGURE 3.10 : ÉVOLUTION DE LA TENEUR GLOBALE EN AMINOACIDES LIBRES DES TUBERCULES ET HAMPES FLORALES DE L'OROBANCHE RAMEUSE PARASITANT LE COLZA (VARIETE SENSIBLE ES ALIENOR).....	250
FIGURE 3.11 : ÉVOLUTION DU PROFIL DES PRINCIPAUX AMINOACIDES LIBRES DES TUBERCULES (A) ET HAMPES FLORALES (B) DE L'OROBANCHE RAMEUSE PARASITANT LE COLZA (VARIETE SENSIBLE ES ALIENOR).....	250
FIGURE 3.12 : ÉVOLUTION DES TENEURS GLOBALES EN GLUCIDES, POLYOLS ET ACIDES ORGANIQUES DES TUBERCULES ET HAMPES FLORALES DE L'OROBANCHE RAMEUSE PARASITANT LE COLZA (VARIETE SENSIBLE ES ALIENOR).....	252
FIGURE 3.13 : ÉVOLUTION DU PROFIL DES PRINCIPAUX GLUCIDES, POLYOLS ET ACIDES ORGANIQUES DES TUBERCULES (A) ET HAMPES FLORALES (B) DE L'OROBANCHE RAMEUSE PARASITANT LE COLZA (VARIETE ES SENSIBLE ALIENOR).	252
FIGURE 3.14 : ÉVOLUTION DE LA TENEUR GLOBALE EN ¹⁵ N (A) ET DE SA REPARTITION ENTRE LES FRACTIONS SOLUBLE ET INSOLUBLE (B) DE L'OROBANCHE RAMEUSE PARASITANT LE COLZA (VARIETE SENSIBLE ES ALIENOR).....	254

FIGURE 3.15 : MINI-RHIZOTRON SYSTEM FOR THE CO-CULTURE OF THE HOST - PARASITE INTERACTION <i>BRASSICA NAPUS</i> L. / <i>PHELIPANCHE RAMOSA</i> (L.) POMEL (A); CLOSE-UP VIEW OF AN EXCISED HOST ROOT PORTION CARRYING A PARASITIC TUBERCLE (FLUORESCENCE MICROSCOPY). THE UPSTREAM HOST ROOT WAS FED WITH DROPLETS OF 6-CARBOXYFLUORESCHEIN (B).....	270
FIGURE 3.16 : AMINO ACID PROFILES OF PARASITIC TUBERCLES (<i>P. RAMOSA</i>) AND HOST ROOTS (<i>B. NAPUS</i>) EXPRESSED AS PERCENTAGE OF THE TOTAL AMINO ACID AMOUNT	272
FIGURE 3.17 : ¹⁵ N ISOTOPOLOGUE ENRICHMENT OF AMINO ACIDS IN PARASITIC TUBERCLES (<i>P. RAMOSA</i>) AND HOST ROOTS (<i>B. NAPUS</i>). THE ISOLATED ORGANS WERE LABELED SEPARATELY THROUGH BATCH INCUBATION IN NH ₄ ⁺ - ¹⁵ N SOLUTION (98 % ENRICHED, 87.5 MM) FOR 1 HOUR.	272
FIGURE 3.18 : GRADUAL ¹⁵ N ISOTOPOLOGUE ENRICHMENT OF AMINO ACIDS IN THE UPSTREAM HOST ROOTS (<i>B. NAPUS</i> , A) AND PARASITIC TUBERCLES (<i>P. RAMOSA</i> , B). THE UPSTREAM HOST ROOTS WERE FED WITH DROPLETS OF NH ₄ ⁺ - ¹⁵ N (98 % ENRICHED, 87.5 MM) DURING 30 MIN, 1 H OR 2 H.....	273
FIGURE 3.19 : GRADUAL ¹⁵ N ISOTOPOLOGUE ENRICHMENT OF AMINO ACIDS IN THE UPSTREAM HOST ROOTS (<i>B. NAPUS</i> , A), PARASITIC TUBERCLES (<i>P. RAMOSA</i> , B) AND THE DOWNSTREAM HOST ROOTS (C). THE UPSTREAM HOST ROOTS WERE FED WITH DROPLETS OF GLN- ¹⁵ N ₂ (98 % ENRICHED, 87.5 MM) DURING 30 MIN, 1 H OR 2 H.....	274
FIGURE 3.20 : "ABSTRACT GRAPHIC"; AMMONIUM ASSIMILATION PATHWAY INTO AMIDES AND AMINO ACIDS DEDUCED FROM ¹⁵ N LABELING EXPERIMENTS AND UPLC-PDA-ESI-MS ANALYSIS IN PARASITIC TUBERCLES (PHELIPANCHE RAMOSA) ATTACHED TO NUTRITIVE HOST ROOT (BRASSICA NAPUS).....	276
FIGURE 3.21 : ÉVOLUTION DE L'ENRICHISSEMENT EN ¹⁵ N ISOTOPOLOGUE DES AMINOACIDES LIBRES DE RACINES DE COLZA (A) ET DE TUBERCULES D'OROBANCHE (B). LES ORGANES ISOLEES ONT ETE INCUBES EN BATCH SEPARES DE ¹⁵ NO ₃ ⁻ (87,5 MM, ENRICHI A 98 %) PENDANT 30 MIN, 1 H ET 2 H.....	280
FIGURE 3.22 : TRAÇAGE DU FLUX DE SEVE PHLOEMIENNE ENTRE <i>B. NAPUS</i> ET DE JEUNES TUBERCULES DE <i>P. RAMOSA</i> , 2 HEURES APRES APPLICATION DE 6-CF SUR L'HOTE.....	286

Liste des abréviations

AAL	: aminoacides libres	GA	: gibbéréline
ABA	: acide abscissique	GDC	: glycine decarboxylase
ACN	: acétonitrile	GDH	: glutamate déshydrogénase
ADNc	: acide désoxyribonucléique complémentaire	GLR	: glutamate receptor-like proteins
AIA	: auxine	GLS	: glucosinolate
AlaAT	: alanine aminotransférase	GOGAT	: glutamine 2-oxoglutarate aminotransférase
AMP	: adénosine monophosphate	GS	: glutamine synthétase
AMPc	: adénosine monophosphate cyclique	HATS	: high affinity transport system
AMT	: ammonium transporter	HEPES	: acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
ANT	: aromatic and neutral (amino acid) transporter	HPLC	: high performance liquid chromatography
AOB	: ammonia-oxidizing bacteria	HR	: réponse hypersensitive ou humidité relative
APC	: amino acid polyamine organocation transporter	ITC	: isothiocyanate
AS	: asparagine synthétase	JA	: jasmonate
ASM	: acibenzolar-S-méthyl	KNO₃	: nitrate de potassium
AspAT	: aspartate aminotransférase	KOH	: hydroxyde de potassium
ATP	: adénosine triphosphate	LATS	: low affinity transport system
BCAA	: branched-chain amino acids	MeJA	: méthyl jasmonate
BSA	: bovine serum albumine	MgCl₂	: chlorure de magnésium
BTH	: benzothiadiazole	miRNA	: microRNA
CAT	: cationic amino acid transporter	M6PR	: mannose-6-phosphate réductase
6-CF	: 6-carboxyfluorescéine	MS	: masse sèche ou mass spectrometry
C-S lyase	: cystéine-sulphoxide lyase	NAD(P)H	: β-nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduit
DMBQ	: 2,6-diméthoxy-1,4-benzoquinone	NaPPI	: pyrophosphate de sodium
DTT	: dithiothréitol	NAXT	: nitrate excretion transporter
EDTA	: acide éthylène diamine tétraacétique	NEDCH	: N-(1-naphtyl) éthylène diamine dihydrochloride
ESI	: electrospray ionization	NH₄⁺	: ammonium
FAD	: flavine adénine dinucléotide	NIN	: nodule inception protein
Fd	: ferrédoxine	NLPs	: NIN-LIKE PROTEINS
FT	: facteur de transcription ou FLOWERING LOCUS T	NOB	: nitrite-oxidizing bacteria

NOS	:	NO synthase
NR	:	nitrate réductase
NRA	:	activité nitrate réductase
NRE	:	nitrate responsive element
NRT	:	nitrate transporter
NUE	:	efficience d'utilisation de l'azote
OAS	:	O-acetyl-serine
OPT	:	oligopeptide transporter
PCD	:	programmed cell death
PCMBBS	:	acide P-chloromercuribenzenesulfonique
PDA	:	photodiode array detector
PMS	:	phenazine methosulfate
PVPP	:	polyvinylpyrrolidone
QTL	:	quantitative trait loci
RNA	:	acide ribonucléique
ROS	:	espèces réactives de l'oxygène
RuBisCO	:	ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase
SAG	:	senescence associated genes
SAM	:	s-adénosyl-méthionine
SAV	:	senescence associated vacuoles
SE	:	standard error
SHMT	:	serine hydroxymethyltransférase
siRNA	:	small interfering RNA
SMC	:	S-méthyl cystéine
SMCSO	:	S-méthyl cystéine sulphoxide
SNK	:	Student Newman Keuls method
SRE	:	efficience de remobilisation du soufre
SULTR	:	sulfate transporter
TCAP	:	tricarboxylic acid pathway
UPLC	:	ultra performance liquid chromatography
VSP	:	vegetative storage proteins

RESUMÉ et MOTS CLÉS

Place de l'azote dans l'interaction plante - plante parasite : *Brassica napus* L. - *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel

L'orobanche rameuse (*Phelipanche ramosa* L. Pomel) dépend entièrement, pour son développement, des nutriments qu'elle prélève dans le phloème de sa plante hôte. En France, l'adaptation de cette orobanche aux cultures de colza d'hiver (*Brassica napus* L.) est devenue un réel problème agronomique dans les régions les plus touchées. En considérant les directives actuelles de réduction significative des intrants azotés et l'importance de la nutrition azotée pour la productivité du colza, ces travaux visent à définir le rôle de l'azote (et autres minéraux associés : soufre et phosphore) dans la mise en place et le fonctionnement de cette interaction plante - plante parasite. Ainsi l'effet bénéfique de la fertilisation azotée sur la production ou l'exsudation dans la rhizosphère du stimulant de germination principal des graines d'orobanche, le 2-PEITC (relations N et S) et sur la sensibilité du colza à l'orobanche a été démontré. De même, l'analyse des flux globaux d'azote (traçage isotopique ^{15}N et profilage des aminoacides) a souligné l'importance du puits surnuméraire précoce que représente l'orobanche vis-à-vis de l'azote réduit circulant dans l'interaction, en précisant l'impact du parasitisme sur le schéma de remobilisation de l'azote et les profils d'accumulation des aminoacides dans les différents compartiments de l'interaction. L'analyse des composés transférés de l'hôte vers le parasite et accumulés dans ce dernier a permis de souligner l'importance des aminoacides et plus particulièrement de la Gln comme transporteur d'azote longue-distance, mais également de mettre en lumière le rôle de composés spécifiques du colza, le SMCSO et les glucosinolates, dans l'interaction, et de l'Asn dans la remobilisation de l'azote chez le parasite.

Mots-clefs : azote, orobanche, colza, fertilisation, ^{15}N

Nitrogen place in the plant - parasitic plant interaction: *Brassica napus* L. - *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel

The broomrape (*Phelipanche ramosa* L. Pomel) strictly relies on nutrient uptake from phloem elements of its host plant. In France, its adaptation to winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) results in a major agronomical problem in the most infested regions. Considering the current guidelines of significant reduction in nitrogen inputs and the importance of nitrogen nutrition on oilseed rape productivity, this work aims to demonstrate the role of nitrogen (and other associated minerals : sulfur and phosphore) in the installation and functioning of this plant - parasitic plant interaction. Thus, the beneficial effect of nitrogen fertilization on the production and/or exudation of a major germination stimulant of broomrape seeds, the 2-PEITC, in oilseed rape rhizosphere, as well as on the rapeseed sensibility to broomrape has been here demonstrated. The analysis of the global nitrogen fluxes (^{15}N isotope tracing and amino acid profiling) clarified the impact of parasitism on the nitrogen remobilization and amino acid accumulation patterns in the different compartments of the interaction. Analysis of transferred compounds from the host toward the parasite and accumulated in it has underlined the importance of amino acids and particularly of Gln as long-distance nitrogen carrier, but has also highlighted the role of specific compounds of rapeseed, SMCSO and glucosinolates, in this interaction, and of Asn in nitrogen remobilisation into the parasite.

Keywords : nitrogen, orobanche, oilseed rape, fertilization, ^{15}N