



Université de Caen  
Basse-Normandie

UNIVERSITE de CAEN/BASSE-NORMANDIE  
U.F.R. : Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée  
Ecole Doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement

THESE

présentée par

**Mme Lucie DUBOUSSET**

(Nom patronymique : LE GOU)

et soutenue

à Caen le **6/11/2009**

En vue de l'obtention du

**Doctorat de l'Université de Caen**

Spécialité : Biologie et Environnement des populations

(Arrêté du 7 août 2006)

**Titre : Effet d'une restriction en sulfate couplée ou non à une limitation en nitrate sur l'efficacité de mobilisation du S et du N foliaire chez le colza d'hiver (*Brassica napus* L.).**



**MEMBRES du JURY**

J-C. DAVIDIAN, Professeur, Montpellier SUP-Agro,

(*Rapporteur*)

C. SALON, Directeur de Recherche, INRA Dijon,

(*Rapporteur*)

K. GALLARDO, Chargée de Recherche, INRA Dijon,

F. LE DILY, Professeur, Université de Caen,

P. ETIENNE, Maître de Conférences, Université de Caen,

(*Co-directeur de thèse*)

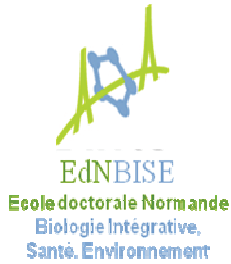
J-C. AVICE, Professeur, Université de Caen,

(*Directeur de thèse*)



Université de Caen  
Basse-Normandie

UNIVERSITE de CAEN/BASSE-NORMANDIE  
U.F.R. : Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée  
Ecole Doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement



THESE

présentée par

**Mme Lucie DUBOUSSET**

(Nom patronymique : LE GOU)

et soutenue

à Caen le **6/11/2009**

En vue de l'obtention du

**Doctorat de l'Université de Caen**

Spécialité : **Biologie et Environnement des populations**  
(Arrêté du 7 août 2006)

**Titre : Effet d'une restriction en sulfate couplée ou non à une limitation en nitrate sur l'efficacité de mobilisation du S et du N foliaire chez le colza d'hiver (*Brassica napus* L.).**



**MEMBRES du JURY**

J-C. DAVIDIAN, Professeur, Montpellier SUP-Agro,	(Rapporteur)
C. SALON, Directeur de Recherche, INRA Dijon,	(Rapporteur)
K. GALLARDO, Chargée de Recherche, INRA Dijon,	
F. LE DILY, Professeur, Université de Caen,	
P. ETIENNE, Maître de Conférences, Université de Caen,	(Co-directeur de thèse)
J-C. AVICE, Professeur, Université de Caen,	(Directeur de thèse)

## **Remerciements**

\*\*\*

*Mon cher enfant,*

*Tu es encore caché en moi pour l'instant mais telle une bouteille à la mer, un jour viendra où ce mémoire de thèse tombera entre tes mains. Sache que mon parcours doctoral fût une tranche de vie dont la finalité a été rayonnante car partagée avec toi.*

*A très vite mon cœur !*

*Car ce mémoire représente l'aboutissement de trois années de travail collectif, d'émotions et de rencontres, je tiens à remercier toutes les personnes ayant participé, de près ou de loin, à cet épisode de ma vie.*

*Grâce à l'ensemble de ces personnes, cette expérience a été unique, diversifiée et enrichissante tant d'un point de vue scientifique qu'humain.*

*Mes remerciements s'adressent, en premier lieu, au directeur du laboratoire, Frédérik Le Dily pour m'avoir orientée sur ce chemin. Tu m'as très chaleureusement accueillie dès le master 1 pour mon premier stage de recherche au sein de l'UMR INRA-UCBN 950 EVA nutriments NCS. Aussi, je te remercie pour avoir répondu présent chaque fois que j'en ai exprimé le besoin.*

*Je souhaite exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse Jean-Christophe Avice pour la confiance qu'il m'a accordée, pour son écoute, et ses nombreuses corrections (souvent nocturnes...). Merci pour ton aide constante particulièrement importante pour les rédactions de publications. Tes précieux conseils m'ont permis d'évoluer dans ma vision de la recherche et dans la façon de la mener. Merci également pour m'avoir soutenue dans mes envies de formations, de congrès, de collaborations... Je garde un excellent souvenir du congrès organisé en Pologne : de mémorables échanges scientifiques, suivis de longues ballades couronnées de fabuleuses glaces aux parfums imprononçables !*

*Je tiens également à remercier tout particulièrement mon co-directeur de thèse, Philippe Etienne, pour m'avoir guidée et épaulée depuis le master. Un grand merci pour m'avoir appris à contrôler les élans de ma plume, ainsi que pour m'avoir initiée au métier d'enseignant-chercheur. Je me souviendrai toujours de mes premiers enseignements de travaux pratiques où tu n'étais jamais loin ! Ta confiance m'a aidée, petit à petit, à voler de mes propres ailes...*

*J'aimerais adresser mes remerciements à Alain Ourry pour avoir souvent supervisé mon travail et pris connaissance de mes résultats. Ta continuelle soif d'hypothèses m'a encouragée à ne pas perdre de vue mes questions de recherche. Merci pour tout.*

*Je souhaite exprimer ma gratitude à l'ensemble de mes lecteurs volontaires et co-auteurs de publications. Je suis très reconnaissante à Philippe Lainé, Jacques Trouverie et Jean-Bernard Cliquet pour leur grande disponibilité quant à la relecture express de ce mémoire.*

*Que l'ensemble des membres de mon jury soit assuré de mes sentiments reconnaissants pour avoir accepté d'examiner ce mémoire. Je suis très honorée que Jean-Claude Davidian et Christophe Salon aient accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Je remercie pareillement Karine Gallardo et Frédérik Le Dily de l'intérêt qu'ils portent à mon travail en acceptant d'en être les examinateurs.*

*Je remercie chaleureusement Nathalie Nesi, Julie Gombert, Jean-Michel Allirand ainsi que Malcolm Hawkesford pour les précieuses collaborations que nous avons pu établir au cours de ma thèse.*

*J'adresse un grand merci à Isabelle Mussio, ma tutrice, Benoît Veron et Pascal Claquin pour m'avoir formée à l'enseignement de la biologie végétale. Merci Isabelle pour ta disponibilité, tes conseils et ta gentillesse.*

*Aussi, j'adresse un remerciement tout particulier aux étudiants avec lesquels j'ai partagé les bons moments de TD et TP. Bonne continuation à tous !*

*Je souhaite exprimer ma reconnaissance à l'école doctorale normande de « Biologie intégrative, Santé, Environnement » ainsi qu'au CIES pour les formations auxquelles j'ai pu participer au cours de ces trois années de thèse. J'en profite pour remercier tout particulièrement Mme Mason et Mme Scoazec pour leurs formations très personnalisées. Je n'oublie pas la formation à la vulgarisation scientifique que l'association Relais d'Sciences m'a apportée. La rencontre avec les collégiens, occasionnée par la fête de la science, a été une formidable expérience !*

*Je remercie également Servane pour m'avoir appris à utiliser Minitab, Josette pour son soutien aux micropesées, Sandrine pour son dévouement à la biologie moléculaire et Jean-Bernard pour son aide lors des réactions fumeuses d'oxydation du  $^{34}\text{S}$ ... Merci à tous ceux qui ont participé à mes différentes récoltes : Merci Jérôme, Anne-Françoise, Raphaël, Jean-Christophe, Philippe, Josette, Virginie, Julie G., Julie L., Julie E., Anne-Sophie, Josiane, Bénédicte, Michelle, Marie-Paule, Frédéric, Maha, Sandrine, Alexandra... pour votre aide, votre bonne humeur et votre motivation durant ces journées chargées.*

*Mille mercis à Raphaël et Anne-Françoise pour les précieuses aides apportées lors de la mise en place des cultures !!!*

*Un grand merci à Marie-Paule et Raphaël pour les nombreuses mises au point et analyses effectuées à l'IRMS.*

*Merci à Dominique, le roi du bricolage, pour toutes les gentillesse du matin auxquelles, je l'avoue, je prenais goût !*

*Mes remerciements s'adressent également aux stagiaires : Isabelle, Alexandra et Philippe D., pour leur volontarisme et sympathie.*

*Merci à tous pour les repas sympathiques que nous avons partagés, les goûters d'anniversaires, les quelques soirées festives, les noëls... et les élans de générosités aux multiples prétextes...*

*Je tiens également à remercier mes compatriotes de thèse, amis et complices qui ont jalonné mon parcours de tous ces moments de complicité qui font chaud au cœur. Je remercie en particulier Valérie, ma pharmacienne préférée, pour son enthousiasme débordant. J'adresse bien évidemment un énorme remerciement à Virginie. Ce fût un plaisir de partager le même bureau mobile ces 3 années ! Que ce soit à l'aquagym ou en cours d'anglais, ou tout simplement au quotidien, on aura bien rit toutes les deux ! Je tiens à remercier également Julie G. et Anne-Sophie pour leur aide et leur gentillesse. Travailler avec vous n'a été que du bonheur ! Mes remerciements s'adressent aussi à mes bonnes vieilles copines Sandra et Céline, si loin, et pourtant si proches...*

*Mes plus profondes pensées s'adressent maintenant à ma famille.*

*Merci à ma sœur, mes parents et beaux-parents pour simplement avoir été là en toutes circonstances, pour m'avoir comprise et soutenue dans mes choix. Merci maman de t'être souciee chaque semaine de mon humeur, de mon alimentation et de mon bien être !*

*Ce chemin n'aurait pu être aussi formidable sans le soutien inconditionnel de mon époux. Car il en faut de la compréhension pour accepter les classeurs, l'ordinateur, ou les livres qui m'accompagnent partout depuis des années : Merci Jérôme pour tes encouragements, ta patience, ton écoute et ta voix de sage...*

*Ainsi, je ne saurais oublier que l'accomplissement de cette thèse m'a permis, tel un « puits », soutenu par mes « sources », de m'épanouir dans un environnement favorable à la maturation ! Alors merci à tous.*

*à ma famille,  
à mon merveilleux mari,  
à la mémoire de Kevin...*

## LISTE DES ABREVIATIONS

### A

**ADNc** : Acide désoxyribonucléique complémentaire

**ANOVA** : Analyse de variance

**APR** : 5'-adenylphosphosulphate réductase

**APS** : 5'-adenylphosphosulphate

**ARN** : Acide ribonucléique

**ATPS** : ATP Sulfurylase

### B

**BSA** : Sérum albumine bovine

### C

**C** : Carbone

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone

**COS** : carbonyl de sulfure

**Ct** : Cycle threshold ou Cycle seuil

### D

**DMS** : Diméthylsulfure

**dNTP** : Désoxyribonucléotide triphosphate

**DW** : Dry Weight

### E

**E** : Efficacité de la PCR

**ERN ou NRE**: Efficience de Remobilisation de N (Nitrogen Remobilization Efficiency)

**ERS ou SRE** : Efficience de Remobilisation de S (Sulfur Remobilization Efficiency)

**EUA ou NUE** : Efficience d'Utilisation de l'Azote (Nitrogen use efficiency)

**EUS ou SUE** : Efficience d'Utilisation du Soufre (Sulfur use efficiency)

### F

**FAME** : Fatty Acid Methyl Ester

**fNRE** : foliar <sup>15</sup>N Remobilization Efficiency

**fSRE** : foliar <sup>34</sup>S Remobilization Efficiency

### G

**GC** : Gas Chromatography

**GS** : Glutamine Synthase

**GSH** : Glutathion (réduit)

### H

**H<sub>2</sub>S** : Dihydrogène de soufre ou Sulfure d'hydrogène

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Acide sulfurique

**ha** : Hectare

**HN** : High N

**HPLC** : Chromatographie liquide haute performante

**HS** : High S

**HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>** : Bisulfite

### I

**IAA** : Acide Indole-3-Acétique

**IRGA** : Infra Red Gas Analyser

**IRN ou NHI** : Indice de Récolte en N (Nitrogen Harvest Index)

**IRS ou SHI** : Indice de Récolte en S (Sulfur Harvest Index)

### K

**K** : Potassium

### L

**LCD** : L-Cystéine Désulphydrase

**LiCl** : Chlorure de lithium

**LN** : Low N

**LS** : Low S

### M

**MF** : Matière Fraîche

**MOT** : Molybden Transporter

**MS ou DM** : Matière Sèche (Dry Matter)

## N

**N** : Azote

**N<sub>2</sub>** : Diazote

**NIRS** : Near InfraRed Spectroscopy

**NNI** : N Nutrition Index

**NR** : Nitrate Réductase

**NUtE** : Nitrogen Utilization Efficiency

## O

**OAS** : O-acétylsérine

**OAS-TL** : O-acétylsérine (thiol) lyase

## P

**P** : Phosphore

**PAPS** : 3'-Phosphoadénosine-5'-phospho sulfate

**PAR** : Rayonnement photosynthétiquement actif

**pb** : Paire de bases

**PC** : Phytochélatines

**PCR** : Polymerase Chain Reaction (ou réaction de polymérisation en chaîne)

**ppm** : Partie par million

## Q

**q** : Quintal

**QSRp** : Quantité de S des tissus « puits » issue de la remobilisation

**QSRs** : Quantité de S remobilisée des tissus « sources »

## R

**RGR** : Relative Growth Rate ou taux de croissance relatif

**RT** : Reverse Transcription

**RuBisCO** : Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase /Oxygénase

## S

**S** : Soufre

**-S** : Absence de fertilisation soufrée

**S<sup>2-</sup>** : Sulfure (sulfide)

**S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>** : Thiosulfate

**S<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup>** : Tétrathionate

**SAM** : S-adenosyl methionine

**SAT** : Sérine acetyl transférase

**SDC** : Sulfur-containing Defense Compounds

**SIR** : Sulfite réductase ferrédoxine-dépendante

**SNI** : S Nutrition Index

**SO<sub>2</sub>** : Dioxyde de soufre

**SO<sub>3</sub>** : Trioxyde de soufre

**SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>** : Sulfite

**SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>** : Sulfate

**SPAD** : Soil plant analysis development

**SSA** : Sunflower seed albumin

**SUte** : Sulfur Utilization Efficiency

**SULTR** : Sulphate Transporter

## T

**Tm** : Température de fusion

## U

**UMR** : Unité Mixte de Recherche

## V

**V-CDT** : Vienna Canyon Diablo Troilite



## TABLE DES MATIERES

Remerciements .....	- i -
Liste des abréviations .....	- v -
Table des matières .....	1
<b>CHAPITRE I - INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>7</b>
I. CONTEXTE GENERAL .....	7
II. OBJECTIFS ET PLAN DE LA THESE.....	9
<b>CHAPITRE II - SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>13</b>
I. GENERALITES SUR LE COLZA D’HIVER .....	13
I.1 Place du colza dans la production oléagineuse .....	13
I.2 Le cycle de développement du colza d’hiver .....	15
I.3 Les fertilisations azotée et soufrée du colza .....	16
II. ACQUISITION ET DEVENIR DU SOUFRE DANS LA PLANTE.....	19
II.1 Les différentes formes de soufre disponibles dans l’environnement .....	19
II.2 Besoins en soufre et mécanismes d’absorption et d’allocation.....	20
II.3 Assimilation du soufre dans la plante .....	23
III. REPONSES DE LA PLANTE A UNE LIMITATION EN S .....	26
III.1 Au niveau agronomique.....	26
III.2 Au niveau physiologique .....	28
III.3 Modifications métaboliques .....	30
III.4 Perturbations hormonales .....	33
IV. STRATEGIES D’AMELIORATION DE L’EFFICIENCE D’UTILISATION DU S .....	34
IV.1 Améliorer l’EUS <i>via</i> l’optimisation du prélèvement du soufre minéral .....	35
IV.1.1 <i>La modification architecturale des racines</i> .....	35
IV.1.2 <i>Le contrôle de l’expression des transporteurs impliqués dans l’absorption du sulfate</i> .....	35
IV.1.3 <i>Les modifications métaboliques</i> .....	36
IV.2 Améliorer l’EUS <i>via</i> l’optimisation de l’utilisation des réserves soufrées endogènes.....	37
IV.2.1 <i>Le contrôle de la « force puits »</i> .....	37
IV.2.2 <i>La mobilisation des réserves soufrées et ses interactions avec l’azote</i> .....	37
<b>PLAN DE RECHERCHE.....</b>	<b>41</b>
<b>CHAPITRE III - MATERIELS &amp; METHODES.....</b>	<b>45</b>
I. MATERIEL VEGETAL ET CONDITIONS DE CULTURES .....	45
I.1 Dispositifs expérimentaux mis en place pour l’étude de l’influence de la fertilisation en N sur la mobilisation soufrée et azotée foliaire .....	46

I.1.1 Mise en place de la culture de colza d'hiver en conditions contrôlées (Desclos, 2008) ..	46
I.1.2 Description du site et dispositif expérimental de culture de colza d'hiver au champ (Gombert, 2006).....	47
I.2 Dispositif expérimental mis en place pour l'étude de l'effet d'une limitation en sulfate couplée ou non à une limitation en nitrate appliquées au stade rosette sur la mobilisation du S et N foliaire.....	48
I.3 Dispositif expérimental mis en place pour l'étude de l'effet d'une limitation en S appliquée à différents stades de développement sur la mobilisation du S et N foliaire et ses conséquences sur les composantes du rendement .....	49
II. MESURES DE L'ETAT PHYSIOLOGIQUE DE LA PLANTE.....	51
II.1 Mesures de l'activité photosynthétique.....	51
II.2 Détermination de la biomasse et mesure de la surface et de la teneur en chlorophylles des différents rangs foliaires .....	51
II.3 Test de viabilité (vigueur germinative) des semences .....	52
III. ANALYSES BIOCHIMIQUES .....	53
III.1 Détermination des teneurs en S et N totaux et des compositions isotopiques en <sup>34</sup> S et <sup>15</sup> N .....	53
III.2 Méthodes de calculs de flux de S et de N remobilisés.....	54
III.3 Extraction et dosage du sulfate.....	56
III.4 Extraction et dosage des protéines solubles.....	56
III.5 Méthodes d'analyses de la composition des graines .....	57
III.5.1 Analyse des lipides .....	57
III.5.2 Détermination des teneurs en huile et en glucosinolates par spectrométrie en proche infrarouge (NIRS).....	58
III.6 Méthodes d'analyses transcriptomiques.....	58
III.6.1 Extraction des ARN <sub>totaux</sub> et reverse transcription (RT) .....	58
III.6.2 Analyse de l'expression des gènes.....	59
III.6.3 Utilisation de l'indicateur moléculaire SAG12/Cab .....	63
IV. EXPLOITATION STATISTIQUE DES DONNEES .....	64
<b>CHAPITRE IV - Etude de l'influence de la fertilisation en N sur la mobilisation soufrée et azotée foliaire.....</b>	<b>67</b>
ABSTRACT .....	68
I. INTRODUCTION .....	69
II. MATERIALS AND METHODS.....	71
II.1 Greenhouse experimental designs, mineral N treatments and sampling.....	72
II.2 Field experiment: experimental site, mineral N treatments and sampling.....	73
II.3 S and N analyses .....	74
II.4 Sulphate extraction and quantification.....	74
II.5 Statistics .....	74
III. RESULTS.....	75
III.1 Greenhouse experiments.....	75
III.2 Field experiment (Exp. F).....	76

IV. DISCUSSION .....	77
IV.1 S dynamic in old leaves and residual S in dead leaves.....	78
IV.2 Is the sulphate well remobilized from old leaves? .....	79
IV.3 S and N dynamics in shoots of plants grown in conditions of sufficient S fertilization and effects of the level of N availability .....	80
<b>CHAPITRE V - Etude de l'effet d'une limitation en sulfate couplée ou non à une limitation en nitrate appliquées au stade rosette sur la mobilisation du S et N foliaire .....</b>	<b>84</b>
ABSTRACT .....	85
I. INTRODUCTION .....	86
II. MATERIALS AND METHODS.....	89
II.1 Plant culture and applications of restricted S and N supply.....	89
II.2 Tissue sampling .....	90
II.3 S, <sup>34</sup> S and N analysis.....	90
II.4 Soluble proteins and sulphate extraction and quantification.....	91
II.5 RNA extraction .....	91
II.6 Reverse Transcription (RT) and semi-quantitative PCR analysis.....	92
II.7 Study of leaf senescence progression using SAG12/Cab indicator .....	93
II.8 Relative expression of <i>BnSultr4</i> and <i>BnSultr1</i> genes using Q-PCR.....	93
II.9 Statistics .....	94
III. RESULTS.....	95
III.1 Effects of limited sulphate supply on shoot growth in the presence and absence of nitrate limitation.....	95
III.2 Effects of limited sulphate supply on leaf senescence progression in the presence and absence of nitrate limitation .....	95
III.3 Effects of limited sulphate supply on leaf N and S composition in old and expanding leaves in the presence and absence of nitrate limitation.....	97
III.4 Effects of limited sulphate supply on soluble proteins in old and expanding leaves in the presence and absence of nitrate limitation.....	97
III.5 Effects of limited sulphate supply on sulphate and <sup>34</sup> S amounts in old and expanding leaves in the presence and absence of nitrate limitation.....	98
III.6 Effects of limited sulphate supply on <i>BnSultr4;1</i> and <i>BnSultr4;2</i> gene expression in old and expanding leaves and on <i>BnSultr1;1</i> and <i>BnSultr1;2</i> gene expression in roots in the presence and absence of nitrate limitation.....	99
IV. DISCUSSION .....	101
IV.1 Is S remobilization in S limited plants related to leaf senescence processes and mineral N availability? .....	101
IV.2 Dynamics of S remobilization and relationships between SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> remobilization / <i>BnSultr4</i> -type gene expression in response to S deficiency is affected by N availability .....	103
<b>CHAPITRE VI - Etude de l'effet d'une limitation en S appliquée à différents stades de développement sur la mobilisation du S et N foliaire et ses conséquences sur les composantes du rendement .....</b>	<b>109</b>
<b>A- Effects of sulphate restrictions applied at different growth stages of winter oilseed rape on yield components and seed quality in relation with plant S and N partitioning.....</b>	<b>109</b>

ABSTRACT .....	110
I. INTRODUCTION .....	111
II. MATERIALS AND METHODS.....	111
II.1 Experimental treatments and Tissue sampling.....	112
II.2 Measurements of real photosynthesis capacities .....	113
II.3 Determination of S and N amounts and analyses of <sup>34</sup> S and <sup>15</sup> N .....	114
II.4 Germination tests .....	115
II.5 Determination of oil and glucosinolate contents by NIRS .....	115
II.6 Determination of oil content and lipids composition of seeds.....	115
II.7 Statistics .....	116
III. RESULTS.....	116
III.1 Effects of limited sulphate supplies on real photosynthesis capacities at GS 76.....	116
III.2 Effects of sulphate availability on dry matter distribution in plants at GS 81 .....	117
III.3 Effects of sulphate availability on S partitioning in plants at GS 81 .....	117
III.4 Effects of sulphate availability on N partitioning in plants at GS 81 .....	118
III.5 Effects of sulphate availability on yield components and seed quality at GS 99 .....	118
III.6 Effects of sulphate availability on final S and N amounts in mature seeds at GS 99....	120
III.7 Effects of sulphate availability on final <sup>34</sup> S and <sup>15</sup> N harvest index in mature seeds at GS 99 .....	120
III.8 Effect of a deprivation in sulphate applied at GS 70 (-S70) on S amount and partitioning in plants .....	121
IV. DISCUSSION .....	121
<b>B- Is the remobilization of S and N reserves for seed filling of winter oilseed rape modulated by sulphate restrictions occurring at different growth stages? .....</b>	<b>126</b>
ABSTRACT .....	127
I. INTRODUCTION .....	128
II. MATERIALS AND METHODS.....	130
II.1 Experimental treatments and Tissue sampling.....	130
II.2 Germination test for determination of seed viability .....	131
II.3 Determination of oil, proteins and glucosinolate contents by NIRS.....	132
II.4 S, <sup>34</sup> S, N, <sup>15</sup> N analysis .....	132
II.5 Calculation of S and N partitioning and remobilisation.....	133
II.6 Statistics .....	134
III. RESULTS.....	134
III.1 Effects of different sulphate availabilities on seed yield and quality at GS 99 .....	134
III.2 Effects of different sulphate availabilities on SHI, NHI, SUE and NUE .....	135
III.3 Effects of different sulphate availabilities on dynamics of <sup>34</sup> S partitioning .....	135
III.4 Effects of different sulphate availabilities on dynamics of <sup>15</sup> N partitioning.....	137
III.5 Effects of different sulphate availabilities on S and N flows between GS70 and GS81	138
III.6 Effects of different sulphate availabilities on residual S and N concentrations in leaves .....	140

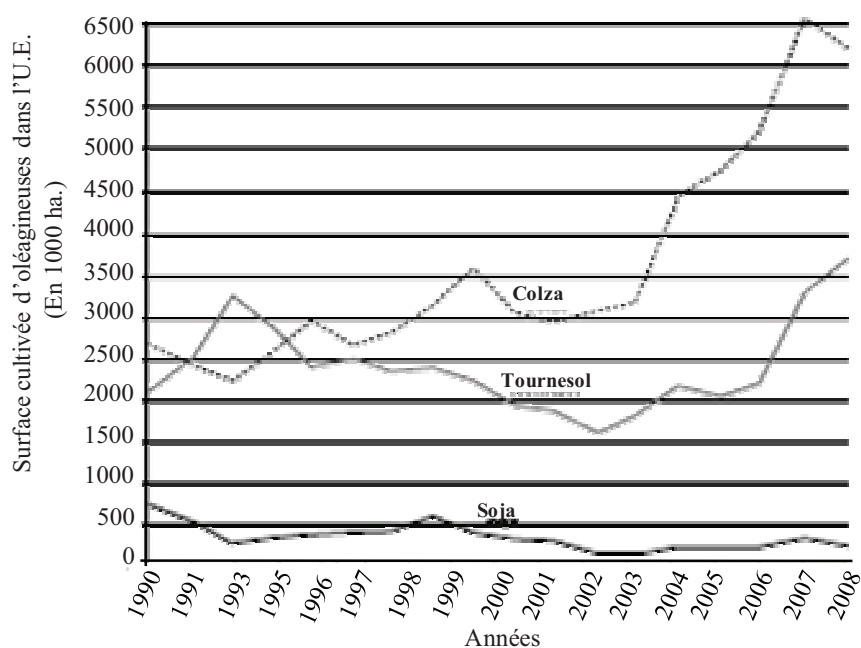
IV. DISCUSSION .....	141
<b>CHAPITRE VII - DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>146</b>
I. LES IMPACTS AGRONOMIQUES D'UNE DISPONIBILITE VARIABLE EN S ET/OU EN N MINERAL AU COURS DU CYCLE DE CULTURE DU COLZA D'HIVER.....	148
I.1 En conditions d'alimentation non limitante en S minéral, et quel que soit le niveau de fertilisation nitrique, le sulfate est fortement séquestré au niveau foliaire .....	149
I.2 Le rendement et la qualité des graines sont étroitement liés à la disponibilité en S et l'impact d'une restriction en S dépend du stade de développement touché .....	150
I.3 L'efficacité de remobilisation du S et du N (principalement foliaire) varie selon la période d'occurrence de la limitation en $\text{SO}_4^{2-}$ au cours du cycle de développement .....	152
II. UNE FERTILISATION SOUFREE AJUSTEE : UNE STRATEGIE D'AMELIORATION DE L'EUS A PRIVILEGIER .....	154
III. INCIDENCE D'UNE DISPONIBILITE VARIABLE EN S ET/OU EN N MINERAL SUR LE STOCKAGE ET LA MOBILISATION DES RESERVES DE S ET DE N FOLIAIRES .....	156
III.1 La remobilisation du S foliaire peut être particulièrement efficace en réponse à une limitation du S minéral .....	156
III.2 La remobilisation du sulfate au sein de la feuille, un processus complexe dépendant du niveau de disponibilité en N exogène.....	157
III.3 Quelle est la contribution de la mobilisation protéique observée au cours de la sénescence dans les mécanismes de remobilisation du S foliaire ?.....	160
<b>CHAPITRE VIII - CONCLUSION GENERALE et PERSPECTIVES .....</b>	<b>163</b>
I. CONCLUSION GENERALE.....	163
II. PERSPECTIVES .....	165
II.1 Perspectives sur le plan physiologique et moléculaire.....	165
II.2 Perspectives sur le plan agronomique : quelles pratiques culturales pour demain ?.....	167
<b>REFERENCES .....</b>	<b>169</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>185</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>192</b>

# Chapitre I

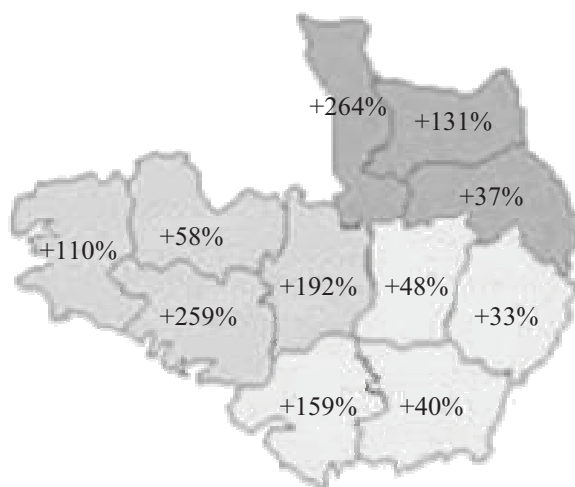
---

## **Introduction générale**

A



B



**Figure I-1 :** A : Evolution des surfaces cultivées d'oléagineuses (colza, tournesol, soja) dans l'Union Européenne (à 15 de 1995 à 2003, à 25 depuis 2004, à 27 depuis 2007) (source : PROLEA<sup>1</sup>). B : Evolutions des surfaces de colza d'hiver entre 2004 et 2007 dans les départements des régions françaises du grand ouest, exprimées en pourcentage d'augmentation par rapport aux valeurs enregistrées en 2004 (Centre, Normandie et Bretagne), source : CETIOM<sup>2</sup>. L'ensemble de ces surfaces a augmenté de 80 % sur cette période, passant ainsi de 75 900 hectares en 2004 à 136 700 hectares en 2007.

1 : [www.prolea.com](http://www.prolea.com)

2 : [www.cetiom.fr](http://www.cetiom.fr)

## **CHAPITRE I**

### **INTRODUCTION GENERALE**

---

---

#### **I. CONTEXTE GENERAL**

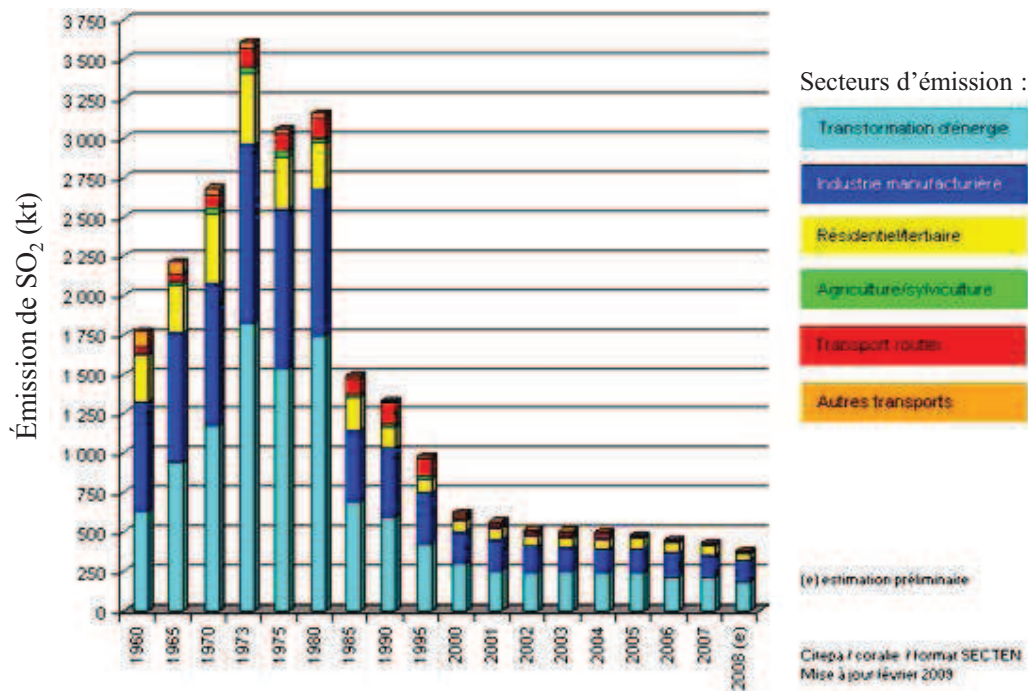
Face à l'expansion massive de la population mondiale dépassant aujourd'hui les six milliards d'habitants, les pratiques agricoles ont profondément évolué (*via* la sélection variétale, l'irrigation, la protection phytosanitaire et l'utilisation massive d'engrais) pour répondre aux besoins alimentaires croissants. Cette intensification de l'agriculture a fait passer la consommation mondiale de fertilisants azotés de 1,3 à 80 millions de tonnes par an de 1930 à 2000 (Frinck *et al.*, 1999), augmentant par là même les risques d'émission de gaz à effet de serre, de pollutions des nappes phréatiques, ainsi que les coûts liés à l'achat des engrais. Ceci est d'autant plus vrai pour le colza (*Brassica napus* L.) qui est une plante de grande culture très exigeante en engrais azotés et soufrés et dont les surfaces de cultures sont en plein essor à l'échelle européenne (Figure I-1A) et mondiale. La mise en place d'une fertilisation raisonnée est donc aujourd'hui devenue indispensable pour des productions plus maîtrisées et respectueuses de l'environnement.

En France, les surfaces consacrées au colza ne cessent de croître, que ce soit au niveau régional (voir situation dans le grand ouest, Figure I-1B) ou national. Elles devraient atteindre 1,7 millions d'hectares en 2010 (source : CETIOM<sup>1</sup>). Cette oléagineuse présente de nombreux débouchés alimentaires et industriels. Ses graines, riches en lipides et en protéines, offrent la

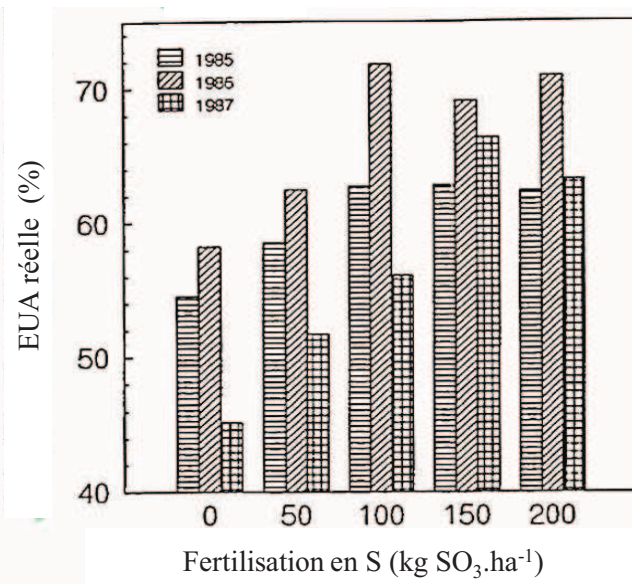
---

<sup>1</sup> [www.cetiom.fr](http://www.cetiom.fr)





**Figure I-2 :** Evolution des quantités de dioxyde de soufre ( $SO_2$ ) dans l'air (en kt) et origines des émissions de  $SO_2$  de 1960 à 2005 en France métropolitaine. (source : CITEPA).



**Figure I-3 :** Influence de la fertilisation soufrée sur l'efficacité d'utilisation réelle de l'azote (EUA réelle) par le colza d'hiver (variétés 00, Wiebke & Glumander) suivie trois années consécutives sur un même site (1985, 1986 et 1987) au nord de l'Allemagne. D'après Schnug et al., 1993.

L'azote a été apporté sous forme d'urée  $200 \text{ kg N.ha}^{-1}$  sur le sol limono-sableux (pH 6,4; 4,2% de matière organique;  $447 \text{ mg.kg}^{-1}$  de S;  $20 \text{ mg.kg}^{-1}$  de sulfate disponible).  $EUA \text{ réelle} = (N \text{ total absorbé sur la parcelle fertilisée} - N \text{ total absorbé sur la parcelle non fertilisée}) / N \text{ apporté par fertilisation}$ . Les fertilisations sont appliquées au début du printemps.

possibilité de produire à grande échelle notamment de l'huile de table, des tourteaux riches en protéines destinés à l'alimentation animale, mais aussi des biocarburants et des dérivés de l'huile à haute valeur ajoutée (produits cosmétiques, lubrifiants...).

Le soufre (S) est un macroélément essentiel pour tous les organismes vivants. Les plantes sont capables d'assimiler du S minéral et de l'incorporer dans leurs composés organiques, tandis que les animaux dépendent entièrement des sources de S organique. Au cours des deux dernières décennies, la disponibilité des sols en S et particulièrement en sulfate est devenue l'un des facteurs limitant la production végétale dans de nombreux pays industrialisés, conséquence indirecte de la mise en place de conventions strictes en matière d'environnement visant à réduire les émissions de S d'origine anthropique (adoptées lors du « Sommet de la Terre » de Rio en 1992, et lors du « Sommet Mondial sur le Développement Durable » de Johannesburg en 2002). En France, les émissions de S dans l'atmosphère ont chuté de 86 % entre 1973 et 2004 (Figure I-2). Ces diminutions de rejets soufrés, également perçues au niveau européen, ont contribué à l'appauvrissement en S des sols (Scherer, 2001).

D'un point de vue agronomique, une carence en S peut engendrer une réduction de la valeur fourragère des récoltes prairiales (Murphy & Quirke, 1997) et une baisse des rendements en particulier des plantes de grande culture telles que le blé et le colza (pouvant aller de -2 à -15 q. ha<sup>-1</sup> en fonction de l'intensité de cette carence, source : CETIOM<sup>1</sup>). Chez les Brassicacées, la carence en S peut également modifier la qualité grainière (altération de la composition protéique et lipidique selon Ahmad et Abdin, 2000a) et l'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA ; Schnug *et al.*, 1993 ; Figure I-3). Or, bien que le colza présente des capacités élevées d'absorption du nitrate (Malagoli *et al.*, 2004), il se caractérise par une faible EUA (Schjoerring *et al.*, 1995), essentiellement liée à un mauvais recyclage de l'azote (N) au cours de la sénescence des feuilles (Malagoli *et al.*, 2005a). En effet, les feuilles qui constituent les organes sources majeurs de N, peuvent chuter avec des teneurs en N élevées (> à 2% de la matière sèche), limitant ainsi le rendement grainier en fin de cycle (Noquet *et al.*, 2004 ; Malagoli *et al.*, 2005a).

D'importants apports de fertilisants soufrés (30 kg de S par ha et par an, sous forme de sulfate) et azotés (150 à 210 kg de N par ha et par an), sont recommandés pour pallier la faible efficacité d'utilisation du S et du N (CETIOM, 2002). De nombreux auteurs ont mis en

---

<sup>1</sup> [www.cetiom.fr](http://www.cetiom.fr)

évidence l'influence du niveau de disponibilité en N du sol sur le prélèvement du S minéral, sa distribution et son assimilation au sein de la plante (Fismes *et al.*, 2000) : des apports élevés de N minéral peuvent aggraver une situation de carence en S et affecter la qualité de l'huile (Asare & Scarisbrick, 1995 ; Ahmad & Abdin, 2000a ; Ahmad *et al.*, 2007). Par ailleurs, une « surfertilisation » de 50 kg.ha<sup>-1</sup> en N peut provoquer (i) une baisse de 0,5 point de la teneur en huile des graines, (ii) un surcoût en engrais azoté et (iii) une consommation d'énergie fossile superflue (source : CETIOM<sup>1</sup>).

L'amélioration de l'efficacité d'utilisation du N (EUA) et du S (EUS) est actuellement devenue une problématique centrale des programmes de recherche concernant la filière colza (programmes ARCOLE<sup>2</sup> et ANR-ENERGY<sup>3</sup> pour l'EUA ; programme ANR-COSMOS<sup>4</sup> pour l'EUS). Cette filière vise à réduire les intrants N et S tout en essayant de maintenir -voire d'augmenter- les rendements actuels. Pour atteindre de tels objectifs, l'optimisation des processus de remobilisation du S et du N des organes de stockage (mobilisation des réserves) ou des tissus sénescents (recyclage par sénescence) constitue la voie principale d'amélioration de l'efficacité d'utilisation de ces éléments.

Dans ce contexte général, cette thèse, financée par une allocation du MESR et soutenue par le programme ANR-COSMOS<sup>3</sup> 2006-2009 au sein de l'UMR INRA-UCBN 950 EVA de Caen, se focalisera sur l'efficacité de mobilisation du S foliaire chez le colza d'hiver cultivé en situation de faible disponibilité en S exogène. L'étude des réponses physiologiques et moléculaires du colza à une limitation en S constitue en effet un nouvel axe de recherche développé au laboratoire et sera abordée en prenant soin de considérer le niveau de disponibilité en N (interactions S / N minéral).

## II. OBJECTIFS ET PLAN DE LA THESE

En vue d'améliorer l'efficacité de mobilisation du S, **l'objectif général de cette thèse est d'étudier les relations sources-puits vis-à-vis du S en recherchant plus particulièrement les bases physiologiques et moléculaires intervenant dans le recyclage**

---

<sup>1</sup> www.cetiom.fr

<sup>2</sup> ARCOLE : Efficacité de la nutrition azotée du colza de printemps : identification de cibles de sélection.

<sup>3</sup> ANR-ENERGY : Improvement of the oil yield of the rapeseed crop in the context of the biofuel production.

<sup>4</sup> ANR-COSMOS: Colza et Soufre : cycle du soufre et Mobilisation des composés soufrés et azotés en réponse à une Oligotrophisation en Soufre (programme ANR JC05-51097).

**des principaux composés soufrés foliaires chez des plantes soumises à des restrictions en S et/ou N minéral.**

A l'échelle de la feuille, le potentiel de mobilisation du S sera abordé par une approche comparative de mobilisation entre plantes soumises à différents niveaux de disponibilité en sulfate et/ou en nitrate prenant en compte les grandes phases de développement foliaire : feuilles mortes (« dead leaf » chapitres IV et VI), sénescence avancée (« old leaf », chapitre V) et en maturation (« expanding leaf », chapitre V).

A l'échelle de la plante, une approche originale basée sur l'utilisation de traceurs  $^{34}\text{S}$  et  $^{15}\text{N}$  permettant de déterminer les flux S et N endogènes inter-organes a été développée afin d'étudier les conséquences d'une limitation en sulfate appliquée à des stades clés du cycle de développement sur les composantes du rendement et sur le niveau de contribution des composés S et N foliaire à la production de graines. Déterminer les stades de développement les plus sensibles à une limitation en S et les plus critiques en terme d'efficacité de mobilisation du S foliaire, constitue en effet la principale sortie de cette étude.

Ce mémoire de thèse débutera par une synthèse bibliographique rappelant le contexte scientifique de la problématique colza. L'intérêt du S pour les plantes ainsi que les impacts agronomiques et physiologiques d'une limitation en S minéral chez le colza et plus généralement chez les Brassicacées seront développés en présentant (i) le caractère indispensable de cet élément au bon fonctionnement de la plante, (ii) les mécanismes qui régissent l'acquisition et l'assimilation du S, (iii) la nature des réserves S chez le colza, ainsi que (iv) les stratégies d'amélioration de l'efficacité d'utilisation du S (EUS) et les phénomènes de mobilisation susceptibles d'être impliqués dans le recyclage foliaire des composés soufrés. A l'issue de cette synthèse bibliographique, les questions de recherche soulevées dans ce travail de thèse ainsi que le groupe d'hypothèses associées, seront alors énoncés.

Les dispositifs expérimentaux ainsi que les méthodes d'analyses mis en place pour répondre aux objectifs de ce travail de recherche doctoral sont décrits dans le chapitre "Matériels & Méthodes".

Les résultats sont ensuite présentés sous la forme de 4 publications scientifiques rédigées en anglais :

**Dubousset, L., Abdallah, M., Desfeux, A-S., Etienne, P., Meuriot, F., Hawkesford, M-J., Gombert, J., Segura, R., Bataille, M.P., Reze, S., Bonnefoy, J., Ameline, A-F., Ourry, A., Le Dily, F., Avice, J-C.** (2009a) 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., Gombert, J., Desclos, M., Allirand, J-M., Etienne, P., Avice, J-C.** (2009b) Study of residual S in leaves reveals low efficiency of remobilization of S in oilseed rape without effect of N availability. (*Soumis à Annals of Botany en Septembre 2009*).

**Dubousset, L., Gautier, V., Nesi, N., Etienne, P., Avice, J-C.** (2009c) Effects of sulphate restrictions applied at different growth stages of winter oilseed rape on yield components and seed quality in relation with plant S and N partitioning. (*Soumis à Plant Cell and Environment en Octobre 2009*).

**Dubousset, L., Etienne, P., Avice, J-C.** (2009d) Is the remobilization of S and N reserves for seed filling of winter oilseed rape modulated by sulphate restrictions applied at different growth stages? (*Soumis à Plant Cell and Environment en Octobre 2009*).

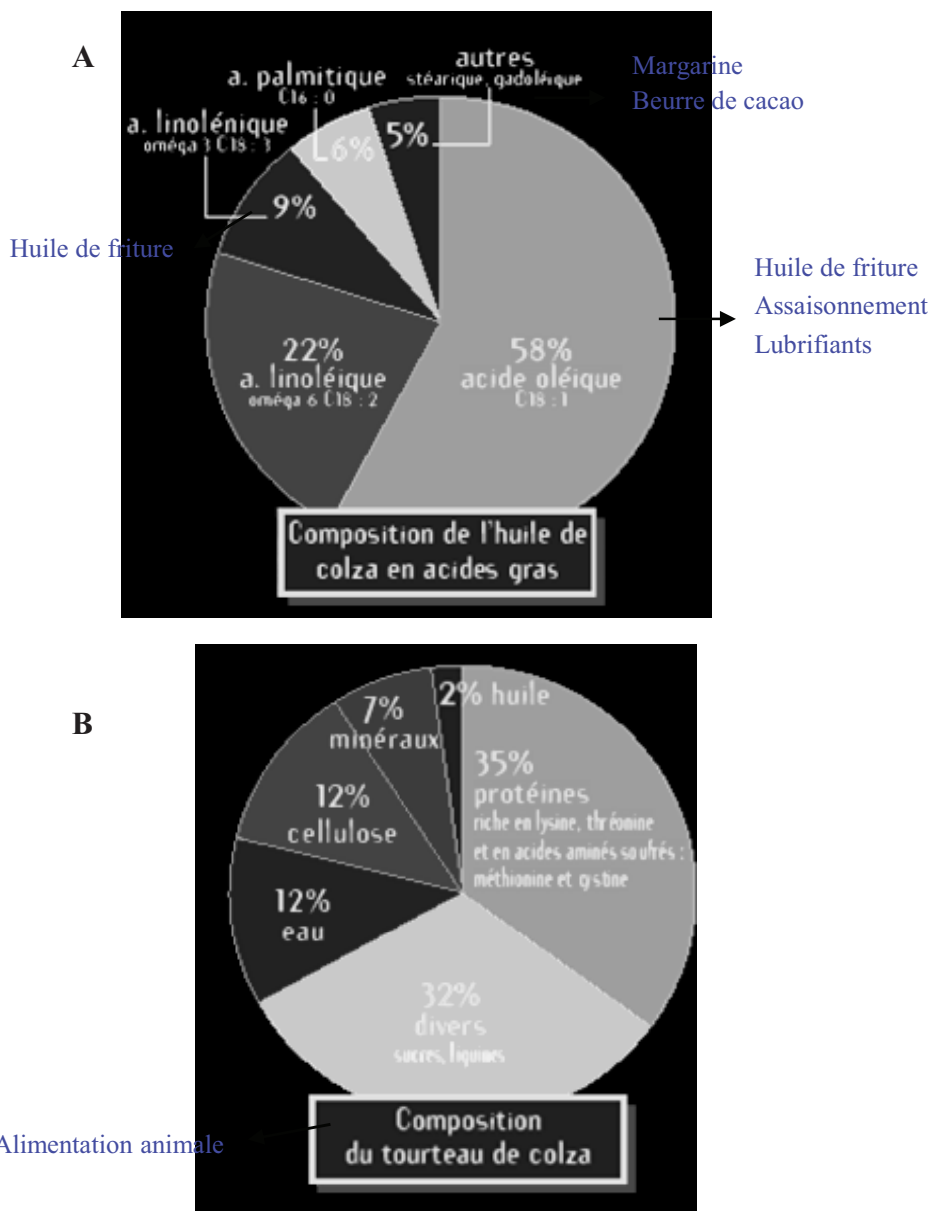
L'ensemble de ces résultats a par ailleurs donné lieu à 4 communications sous forme de posters dont les résumés sont annexés à ce document.

Les principaux résultats sont repris de manière synthétique au sein du chapitre « Discussion générale » puis les principales conclusions et les perspectives qui découlent de ces travaux sont proposées en fin de document.

# Chapitre II

---

## **Synthèse bibliographique**



**Figure II-1 :** Composition et exemples de débouchés industriels de l'huile (A) et du tourteau de colza dépourvu d'acide érucique (B). Source : PROLEA<sup>1</sup>.

Les différentes applications alimentaires et industrielles du colza sont indiquées en bleu. L'huile et les tourteaux de colza sont les filières les plus exploitées actuellement. En effet, l'huile est prisée par l'industrie alimentaire car elle contient des acides gras essentiels (acides linoléique et linoléique) et peu d'acides éruciques et de glucosinolates, néfastes pour la santé humaine (source : Maisadour semences<sup>2</sup>). Les tourteaux de colza, majoritairement composés de protéines, de glucides et de lipides, sont souvent préférés aux tourteaux de soja pour l'alimentation animale (source : PROLEA<sup>1</sup>). D'autres débouchés du colza ont récemment fait leur apparition : le diester (ou ester de méthyle) d'une part, qui représente 80% des biocarburants mis actuellement sur le marché français et dont l'utilisation limite la production de gaz à effet de serre (Source: site du Diester<sup>3</sup>) et l'ASAM (Anhydride Succinique d'Alkénoate de Méthyle) d'autre part, qui transforme la cellulose du bois en ester de cellulose, le rendant indigeste pour les insectes. Ce produit pénètre dans les alvéoles du bois et lui confère l'imputrescibilité (source : INRA<sup>4</sup>).

1 : [www.prolea.com](http://www.prolea.com)

2 : [www.maisadour-semences.com](http://www.maisadour-semences.com)

3 : [www.diester.fr](http://www.diester.fr)

4 : [www.inra.fr](http://www.inra.fr)

## **CHAPITRE II**

### **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

---

#### **I. GENERALITES SUR LE COLZA D'HIVER**

##### **I.1 Place du colza dans la production oléagineuse**

Développé en France au début des années 60, suite à la régression des importations d'huile tropicale, le colza est cultivé pour ses graines riches en lipides, et dans une moindre mesure, en protéines. Les graines de colza sont destinées à être traitées dans des usines de trituration afin d'en dissocier l'huile brute (40 à 44% de la graine) du tourteau résiduel riche en protéines (Figure II-1). De nombreux débouchés alimentaires et industriels sont alors possibles : huile de table, produits cosmétiques, agents anti-poussières... La production de lubrifiants ou encore de diester, un bio-carburant obtenu par estérification de l'huile de colza par du méthanol, constituent également des débouchés en plein essor (source : PROLEA<sup>1</sup>).

Résultant de la progression des rendements moyens (pouvant atteindre près de 38 quintaux par hectare par exemple aux Pays-Bas en 2008) et des surfaces (atteignant environ 6 millions d'hectares en 2008 au sein de l'Union Européenne), la production européenne d'oléagineux a fortement augmenté. En 2004, du fait de l'entrée de 10 nouveaux pays dans l'Union Européenne, les surfaces de cultures de plantes oléagineuses ont progressé de 33% (+5% pour le soja, +25% pour le tournesol, +40% pour le colza). En 2007, avec l'entrée de la Bulgarie et de la Roumanie dans l'Union Européenne, les surfaces dédiées à la culture du

---

<sup>1</sup> [www.prolea.com](http://www.prolea.com)



colza ont à nouveau progressé de 21% (source : PROLEA<sup>1</sup>). Ainsi, par ordre d'importance, l'Union Européenne, la Chine, le Canada et l'Inde représentent près de 90% de la production mondiale de colza, s'élevant à environ 55 millions de tonnes de graines en 2008. Parmi les pays producteurs émergents, l'Ukraine et la Russie présentent un fort potentiel de progression.

La production de colza a néanmoins connu des difficultés historiques liées :







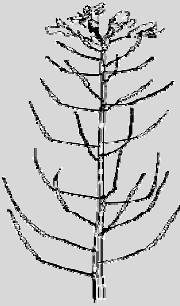
- (i) à des problèmes phytosanitaires engendrant l'utilisation fréquente de pesticides pour lutter contre les adventices (ray-grass, vulpin, brôme...), les plantes parasites (orobanche), les ravageurs (limaces, méligèthes, pucerons, charançons), et les maladies fongiques telles que la nécrose du collet engendrée par *Phoma lingam*, la nécrose des pétales infectés par *Sclerotinia sclerotiorum*, ou encore l'alternariose provoquant l'éclatement des siliques infectées par *Alternaria brassica*,
- (ii) à la qualité nutritionnelle des tourteaux destinés à l'alimentation du bétail, notamment la présence de produits de dégradation des glucosinolates qui sont responsables de problèmes d'inappétence, surtout chez les bovins, et de désordres physiologiques chez les animaux monogastriques,
- (iii) à la qualité nutritionnelle des huiles destinées à l'alimentation humaine. C'est particulièrement le cas de l'acide érucique, dont la présence dans l'huile est toxique pour l'homme à dose importante, mais qui peut être intéressante comme additif alimentaire à faible dose. Depuis plusieurs années, pour faire face aux désagréments alimentaires liés à la présence d'acide érucique, des variétés dites "00" ou double zéro caractérisées par une teneur en acide érucique inférieure à 2 % de la fraction lipidique et une teneur en glucosinolates inférieure à 20 micromoles par gramme, ont été sélectionnées pour l'alimentation (Nesi *et al.*, 2008).

Comme nous le verrons plus en détail dans le § I.3, le bilan agro-environnemental de cette culture est par ailleurs médiocre étant données les fortes doses d'engrais N utilisées (150

---

<sup>1</sup> [www.prolea.com](http://www.prolea.com)

**Tableau II-1 :** Principaux stades repères du développement ontogénétique du colza d'hiver, la nomenclature anglo-saxonne est indiquée entre parenthèses. D'après documentation CETIOM<sup>1</sup>. Un stade est atteint lorsque 50% des plantes sont à ce stade.

<p>Stade A</p> 	<p><b>A- Stade cotylédonaire</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•Levée : les jeunes plantes marquent la ligne.</li> <li>•Stade A (10) : stade cotylédonaire. Pas de feuilles “vraies”. Seuls les deux cotylédons sont visibles.</li> </ul>
<p>Stades B</p> 	<p><b>B- Formation de la rosette</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•Stade B : apparition des feuilles. Pas d'entre-noeud entre les pétioles. Absence de vraie tige.</li> <li>•Stade B1 (11) : 1 feuille vraie étalée ou déployée.</li> <li>•Stade B2 (12) : 2 feuilles vraies étalées ou déployées.</li> <li>•Stade B3 (13) : 3 feuilles vraies étalées ou déployées.</li> <li>•Stade B4 (14) : 4 feuilles vraies étalées ou déployées.</li> <li>•Stade Bn (1n) : n feuilles vraies étalées ou déployées.</li> </ul>
<p>Stade C</p> 	<p><b>C- Montaison</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•Stade C1 (31) : reprise de végétation. Apparition de jeunes feuilles.</li> <li>•Stade C2 (32) : entre-noeuds visibles. On voit un étranglement vert clair à la base des nouveaux pétioles. C'est la tige.</li> </ul>
<p>Stade D</p> 	<p><b>D- Boutons accolés</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•Stade D1 (51) : boutons accolés encore cachés par les feuilles terminales.</li> <li>•Stade D2 (53) : inflorescence principale dégagée. Boutons accolés. Inflorescences secondaires visibles. Au cours de ce stade, la tige atteint et dépasse la hauteur de 20 cm mesurée entre la base de la rosette et les bouquets floraux.</li> </ul>
<p>Stade E</p> 	<p><b>E- Boutons séparés</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•Stade E (59) : les pédoncules floraux s'allongent en commençant par ceux de la périphérie.</li> </ul>
<p>Stade F</p> 	<p><b>F- Floraison</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•Stade F1 (60) : premières fleurs ouvertes.</li> <li>•Stade F2 (61) : allongement de la hampe florale. Nombreuses fleurs ouvertes.</li> </ul>
<p>Stade G</p> 	<p><b>G- Formation des siliques</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•Stade G1 (70) : chute des premiers pétales. Les 10 premières siliques ont une longueur inférieure à 2 cm. La floraison des inflorescences secondaires commence à ce stade.</li> <li>•Stade G2 : les 10 premières siliques ont une longueur comprise entre 2 et 4 cm.</li> <li>•Stade G3 : les 10 premières siliques ont une longueur supérieure à 4 cm.</li> <li>•Stade G4 (73) : les 10 premières siliques sont bosselées.</li> <li>•Stade G5 (81) : grains colorés.</li> </ul>

à 210 kg N ha<sup>-1</sup>) (source : CETIOM<sup>1</sup>, Rathke *et al.*, 2006). La gestion raisonnée de la fertilisation azotée apparaît donc nécessaire afin de limiter les coûts de fertilisation et ses conséquences environnementales (pollution nitrique).

## I.2 Le cycle de développement du colza d'hiver

Le colza est une plante annuelle à fleurs jaunes de la famille des Brassicacées issue de l'hybridation naturelle entre le chou (*Brassica oleracea* L.) et la navette (*Brassica campestris* L.). C'est une plante à racine pivotante, tige rameuse et feuilles glabres aux morphologies différentes selon leurs positions nodales. Les feuilles inférieures sont en effet pétiolées et découpées, tandis que les supérieures sont lancéolées et entières.

On distingue deux types de colza : le colza d'hiver et le colza de printemps (ou canola), qui diffèrent de par leur cycle de développement pouvant atteindre 310 jours pour le colza d'hiver, contre 150 jours pour le colza de printemps.

Les principaux stades de développement du colza d'hiver sont répertoriés dans le Tableau II-1. Le colza d'hiver est semé au début de l'automne et développe, en fin d'hiver un pivot et une rosette d'une vingtaine de feuilles. C'est sous cette forme que la plante passe la période hivernale. A ce stade, le colza d'hiver entre en vernalisation et peut supporter de faibles températures (Merrien & Pouzet, 1988) nécessaires à son initiation florale. Au retour des températures plus douces en sortie d'hiver, il y a reprise de végétation et de nouvelles feuilles apparaissent. La reprise de végétation est influencée par la date de l'initiation florale, donc en partie par la date du semis (Tittonel, 1988). Les inflorescences s'ébauchent aux apex caulinaires tandis que commence l'élongation des entre-nœuds supérieurs. La floraison dépend essentiellement de la photopériode et a donc lieu à une date relativement stable (Leterme, 1988), bien avant que la tige n'ait atteint sa taille définitive ; la ramification de la tige se produit alors que la montaison et la floraison se poursuivent. Les boutons floraux s'épanouissent de bas en haut de l'inflorescence. Bien que les semis les plus tardifs puissent avoir des initiations florales tardives (Mendham & Salisbury, 1995), la floraison est davantage influencée par la précocité des cultivars que par la date de semis. Certains facteurs climatiques comme le gel en début de floraison peuvent conduire à une augmentation de la durée de floraison. Ainsi, en France, la floraison du colza d'hiver s'étend de la fin-mars à la mi-mai

---

<sup>1</sup> [www.cetiom.fr](http://www.cetiom.fr)

selon les conditions climatiques et le génotype. Sur une même plante, sont présentes des siliques d'âges physiologiques très différents. A maturité, le moindre choc peut provoquer la déhiscence des siliques et la chute des graines.

Généralement cultivé dans les rotations céréalières, le colza d'hiver permet d'augmenter le rendement en céréales (de +7 à 30 % pour un blé après colza, par rapport à un blé en monoculture ; source : CETIOM<sup>1</sup>) et joue un rôle épurateur de l'excédent nitrique du sol en automne. Cette espèce est qualifiée de nitrophile de par sa forte capacité d'absorption du nitrate. Cependant, une fois absorbé, une proportion relativement faible de cet N est utilisée pour l'élaboration des tissus récoltés. Cette observation reflète une faible efficience d'utilisation de l'azote (EUA).

### I.3 La fertilisation azotée et soufrée du colza

L'IRN (Indice de Récolte en N) ou NHI (pour Nitrogen Harvest Index) représente la part de N dans les graines par rapport au N présent dans l'ensemble des parties aériennes à la récolte. Malgré une capacité d'absorption du nitrate particulièrement élevée, le colza possède un IRN généralement inférieur à 50%, alors que, chez les céréales, celui-ci peut dépasser 80%. En conséquence, le colza requiert une fertilisation azotée particulièrement importante par rapport à d'autres cultures. Pour obtenir une production de graines de 10 q ha<sup>-1</sup>, il faut apporter 30 kg N ha<sup>-1</sup> chez le blé, contre 50 à 70 kg N ha<sup>-1</sup> chez le colza. Compte tenu du rendement grainier moyen du colza (environ 30 q ha<sup>-1</sup>), une fertilisation azotée de 150 à 210 kg N ha<sup>-1</sup> est généralement nécessaire (Rathke *et al.*, 2006).

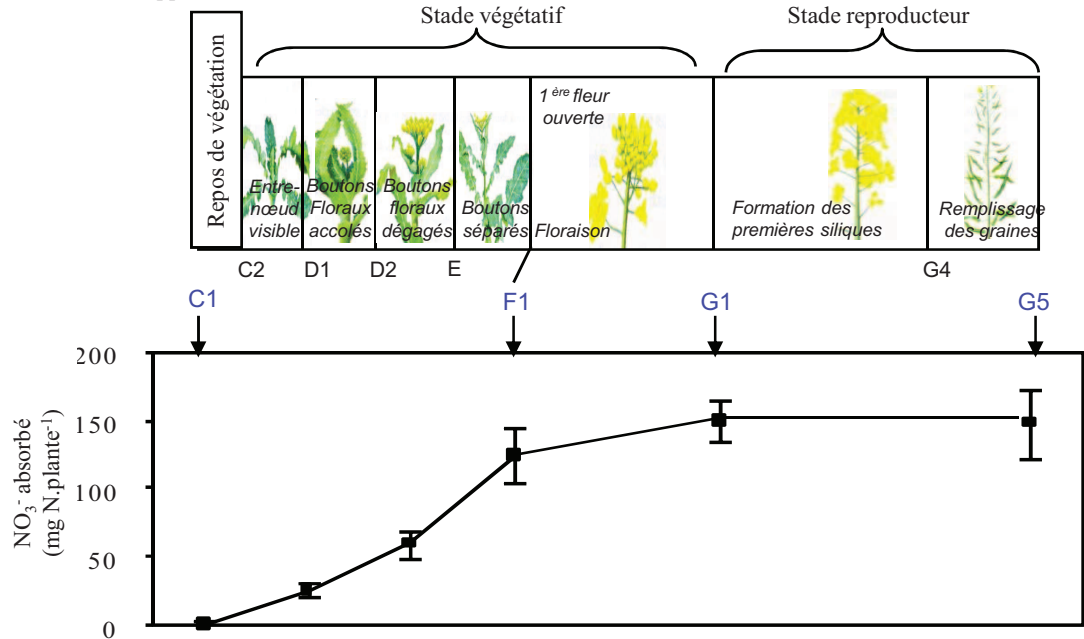
Le colza a des besoins importants en N en fin d'hiver et au printemps c'est-à-dire à la période de reprise de végétation (Figures II-2A), alors que les disponibilités en N du sol sont assez faibles (Dejoux, 1999). De manière à satisfaire les besoins de la plante et à obtenir un fort indice foliaire à la floraison, il est alors recommandé d'apporter une quantité importante d'engrais dès la reprise de végétation. La dose à utiliser dépend donc du reliquat en sortie hiver. Si la dose dépasse 100 kg N ha<sup>-1</sup>, il est conseillé de réaliser 2 apports, voire 3 si la dose est au-delà de 170 kg N ha<sup>-1</sup> (le premier apport ayant toujours lieu à la reprise de végétation ; source : CETIOM<sup>1</sup>).

---

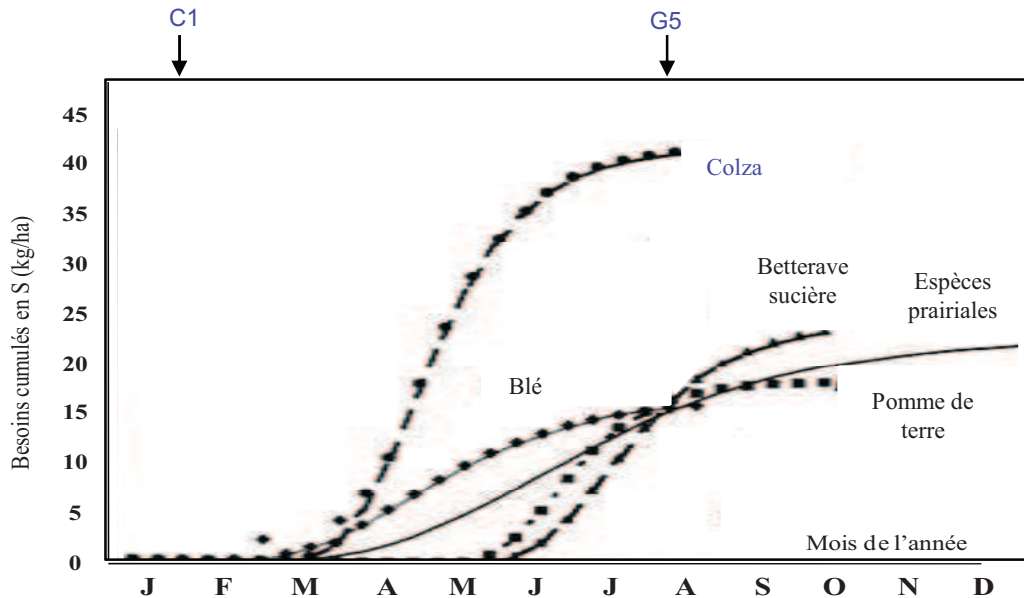
<sup>1</sup> www.cetiom.fr

A

Stade de développement du Colza :



B



**Figure II-2 :** A : Evolution de l'absorption cumulée de l'azote minéral (nitrate) exprimé en mg N.plante<sup>-1</sup> au cours des principaux stades de développement du colza. Les barres verticales indiquent la moyenne  $\pm$  ES, pour n = 6. Modifiée d'après Rossato et al., 2001. B : Exigence en S de 5 grandes cultures des Pays-Bas durant une année. La demande en S est différente selon l'espèce et la saison (d'après Postma et al., 1999)

Des excès de fertilisation azotée ne sont pas sans conséquence pour l'environnement. Ils conduisent non seulement à une accumulation de N minéral dans le sol (Shepherd & Sylvester Bradley, 1996), mais aussi à une teneur en N élevée des résidus de récolte susceptibles de se minéraliser pendant l'interculture. En effet, la quantité de N notamment issu de la minéralisation du N organique contenu dans les feuilles mortes tombées au sol au cours de la période automno-hivernale, peut atteindre  $190 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$  (Dejoux, 1999). Ainsi, en contre partie de ses avantages de « piège à nitrate » à l'automne, c'est-à-dire pendant la période où les pertes de nitrate par lessivage sont les plus importantes, le colza présente une mauvaise EUA. Cette dernière peut générer un report de pollution nitrique à l'automne suivant sa récolte mais peut également être profitable à la culture suivante (ex : blé après colza).

L'indice de récolte en S (IRS ou pourcentage de S dans les graines par rapport au S présent dans l'ensemble des parties aériennes) est également très faible puisqu'il est égal à seulement 20% en fin de cycle (McGrath & Zhao, 1996). Les besoins en S du colza sont par ailleurs largement supérieurs à la plupart des autres espèces de grande culture (par exemple le blé ; Figure II-2B).

Le S entrant principalement dans la composition des acides aminés et des protéines, son absorption et son assimilation sont fortement conditionnées par le statut N de la plante et *vice versa* (Kopriva *et al.*, 2000). Un apport de N stimule le prélèvement de S et la croissance (production de biomasse plus importante ; Zhao *et al.*, 1993 ; Kast *et al.*, 1995).

La teneur en S des parties aériennes des plantes diffère d'une espèce à l'autre, variant de 0,25 % à 0,80 % de la matière sèche (MS) respectivement dans les feuilles de trèfle et de colza. Le ratio S/N des teneurs pondérales en S et N varie de 1/20 (trèfle) à environ 1/7 (colza) ce qui révèle chez ces deux espèces cultivées des besoins en S différents. Janzen & Bettany (1984) ont proposé un ratio N assimilable / S assimilable = 7 comme valeur optimale pour le colza dans l'objectif d'une utilisation efficace du N et du S (avec une incorporation maximale dans les graines). Aussi, différents modes de fertilisation soufrée sont possibles (Tableau II-2) selon la nature du sol. Le sulfate de magnésium apporté sous forme de kiesérite granulé est particulièrement adapté aux sols pauvres en magnésie. Cependant, l'apport de S est généralement associé à un apport de N (Tableau II-2) et doit être réalisé au printemps. Le sulfate d'ammoniaque ne doit pas être épandu sur végétation humide ou gelée. Les apports de S sous forme de sulfonitrate d'ammoniaque, d'ammonitrate soufré ou d'autres solutions N/S

**Tableau II-2 :** Principaux engrais soufrés utilisables en France (CETIOM<sup>1</sup>)

<sup>(1)</sup> Proportion variable selon les distributeurs

Engrais	Proportion de SO <sub>3</sub> <sup>(1)</sup>	Apport minimal pour 75 unités de SO <sub>3</sub> /ha en kg	Élément associé au soufre % <sup>(1)</sup>
Sulfate d'ammoniaque	60%	125	21% N
Sulfonitrate d'ammoniaque	32,5%	230	26% N
Ammonitrate soufré	13%	580	26% N
Solution azotée soufrée	14%	860	20,6% N
Superphosphate de chaux	30%	250	18% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Superphosphate de chaux	20%	375	25% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Sulfate de potassium	45%	170	50% K <sub>2</sub> O
Kiesérite granulé (sulfate de magnésium)	50%	150	25% MgO

(Tableau II-2) sont bien adaptés au 2<sup>ème</sup> apport de N. Le CETIOM<sup>1</sup> recommande un apport d'environ 30 unités de S quel que soit les conditions de culture ou le statut S du sol.

---

<sup>1</sup> [www.cetiom.fr](http://www.cetiom.fr)



### Synthèse d'acides aminés soufrés

Cystéine, Méthionine,  
Homocystéine

### Métabolisme

SAM / SMM  
Méthylations

### Groupements prosthétiques

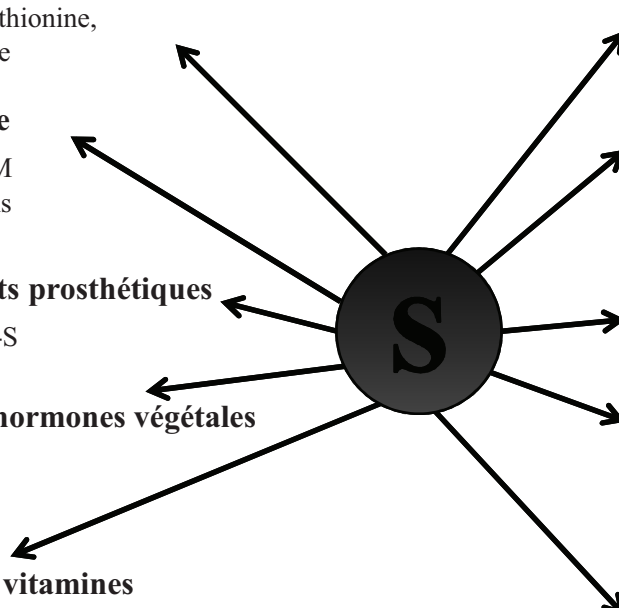
Liaisons Fe-S

### Synthèse d'hormones végétales

Ethylène  
Polyamines

### Synthèse de vitamines

Biotine  
Thiamine



### Synthèse de protéines

Acétyl Coenzyme A

### Synthèse de métabolites secondaires

Glucosinolates  
Composés sulfatés

### Synthèse de sulfolipides

Coenzyme A

### Réponse aux stress

GSH  
PCs  
Thionines

### Régulation des métabolismes azoté et carboné

**Figure II-3 :** Rôles multiples du S dans le métabolisme des végétaux supérieurs (adaptée d'après Hesse et Hoefgen, 2003).

Les molécules antioxydantes telles que les phytochélatines (PCs) et le glutathion sous forme réduite (GSH) sont de petits polypeptides intracellulaires possédant la séquence d'acides aminés ( $\gamma$ -Glu-Cys) $_n$ -Gly, où  $n = 2$  à  $11$  pour les PCs et  $n=1$  pour le GSH, et une très grande affinité pour les métaux grâce à leurs fonctions thiol (SH) et carboxyle (COOH).

Le S est nécessaire à la formation d'acides aminés essentiels (cystéine, méthionine, homocystéine) nécessaires à la synthèse des protéines. La structure tertiaire des protéines peut également être modelée par l'établissement de liaisons disulfures, par oxydation des groupements thiols de ces acides aminés. Le S, au travers de son rôle dans la conformation des protéines, est à l'origine de l'activité catalytique des enzymes (Droux, 2004).

Le S entre également dans la composition de nombreuses autres molécules indispensables au fonctionnement de la cellule végétale et à la croissance de la plante : vitamines (thiamine impliquée dans le métabolisme des lipides, biotine), cofacteurs (centre Fe-S, hème, ...), coenzyme A régissant l'orientation des substrats assimilés soit vers la lipidogenèse, soit vers la protéogenèse (Merrien et al. 1989), S-méthylméthionine (SMM), S-adenosylméthionine (SAM), molécule donneuse de groupement méthyl nécessaire à la synthèse de chlorophylles et d'éthylène.

## II. ACQUISITION ET DEVENIR DU SOUFRE DANS LA PLANTE

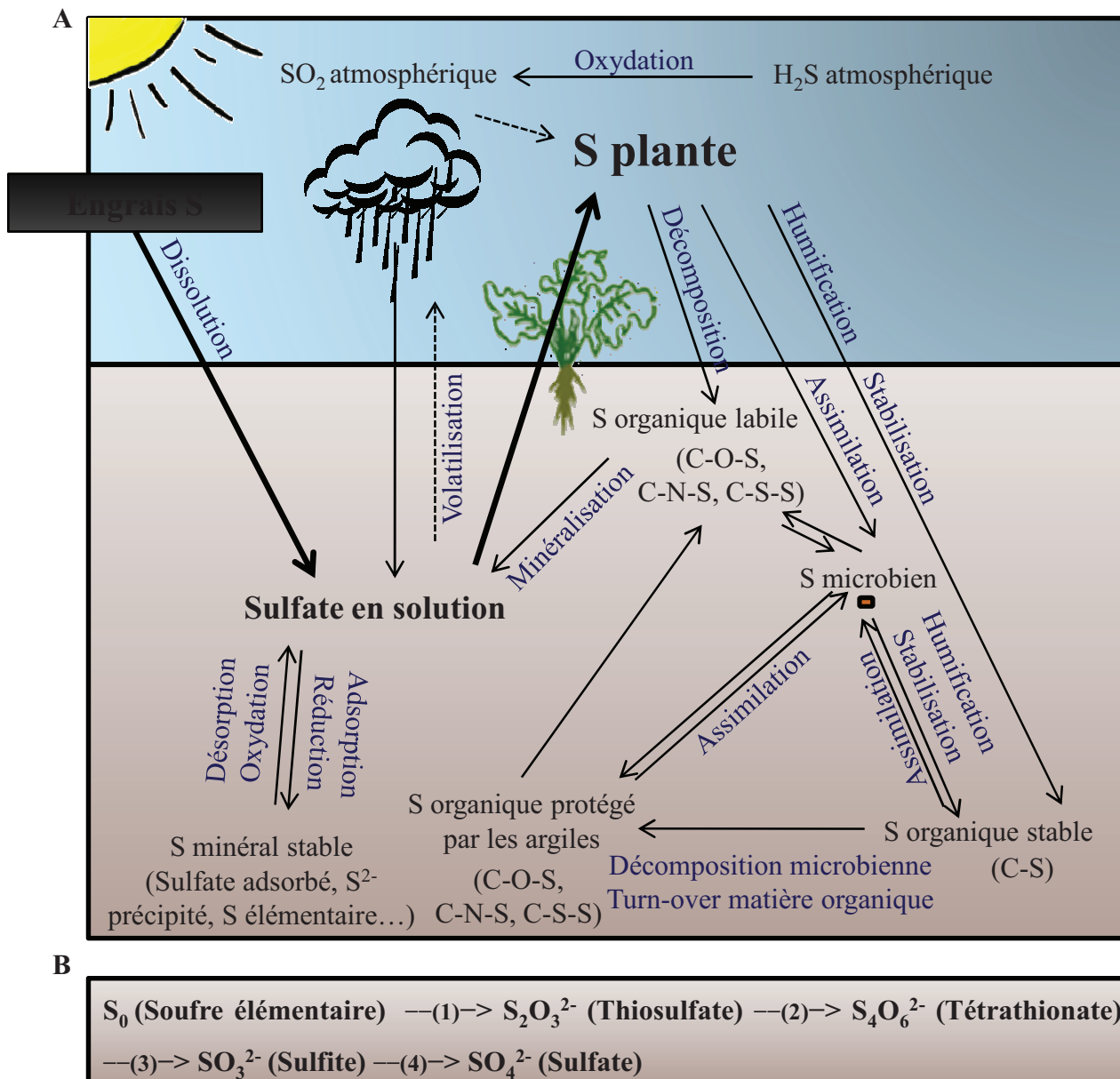
### II.1 Les différentes formes de soufre disponibles dans l'environnement

Le soufre est quantitativement le 4<sup>ème</sup> élément le plus important pour les végétaux après l'azote (N), le phosphore (P), et le potassium (K). C'est un élément essentiel à la croissance des végétaux car il est impliqué dans la synthèse des acides aminés soufrés (cystéine et méthionine), de peptides (glutathion, phytochélatines), des protéines (rôle important dans la stabilité de la structure tertiaire par des ponts disulfures après oxydation des groupements SH), du coenzyme A, des vitamines, ou encore de composés soufrés divers tels que les glucosinolates ou les phytoalexines (Figure II-3). Les plantes peuvent prélever le S dont elles ont besoin au niveau de l'atmosphère et du sol.

Les sources naturelles de S dans l'atmosphère sont sous forme de dihydrogène de S ( $H_2S$ ) de diméthylsulfure (DMS ou  $CH_3SCH_3$ ), ou encore de carbonyl de sulfure (COS) et sont issues des éruptions volcaniques, des échanges gazeux avec l'océan, de la décomposition de la matière organique et des rejets industriels issus de la combustion des énergies fossiles. Le sulfure d'hydrogène ( $H_2S$ ) est rapidement oxydé en  $SO_2$ , lui-même oxydé pour donner de l'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ), qui se dépose sur le sol avec les pluies et les brouillards. Actuellement sur le territoire français, Vis & Goujard (2005) ont estimé que le dépôt total (sources de S atmosphérique naturelle et d'origine anthropique) se situait aux environs de 4 kg de S par hectare et par an. Le sulfate (issu de l'acide sulfurique) ainsi déposé sur le sol peut alors être immobilisé dans des minéraux insolubles (par adsorption sur les oxydes de fer et d'aluminium) et protégé par les argiles ou rester dissous sous forme ionique (Figure II-4A).

La teneur en S total des sols varie de 20 ppm pour les sols sableux à plus de 600 ppm dans les sols argileux. Toutefois, dans certains sols, cette proportion peut atteindre 5000 ppm soit 0,5 % du S dans les sols dits « organiques » (Fismes-Bemer, 1998). Ainsi, ces différents pools de composés soufrés organiques et minéraux coexistent dans le sol et sont soumis à une dynamique très importante selon un cycle nécessitant l'intervention de processus de minéralisation et de stabilisation (Figure II-4A).

La proportion des formes organiques de S est variable selon le type de sol et les conditions climatiques (Eriksen *et al.*, 1998). Dans les sols des régions tempérées et humides, elle représente environ 95 % du S présent (Eriksen *et al.*, 1998). Le S organique peut se



**Figure II-4 : A :** Cycle du S dans le système sol-plante. Le S minéral se présente sous forme de sulfate adsorbé ou de sulfure précipité tandis que le S organique se présente sous forme d'esters de sulfate ou de S directement lié au carbone (d'après Fismes, 1998). **B :** Etapes d'oxydations du S élémentaire en sulfate.

Bien que des bactéries photosynthétiques anoxygènes soient nombreuses à présenter une capacité d'oxydation des composés soufrés tels que le S élémentaire, le thiosulfate et le sulfite, ces étapes réactionnelles sont essentiellement caractérisées chez les bactéries sulfo-oxydantes du genre *Thiobacillus* qui sont aérobies chimiolithotrophes. L'ensemble de ces réactions enzymatiques fait intervenir des systèmes d'oxydation complexes en cours de caractérisation. Des protéines de type SOX (« sulfur oxidising enzymes ») seraient impliquées chez les  $\alpha$ -protéobactéries (Friedrich et al., 2001). L'étape (1) pourrait faire intervenir une oxygénase-réductase du S élémentaire (« SOR », homologue de la « SOR » cytoplasmique connue chez les archées). L'oxydation des composés soufrés en sulfate est en grande partie réalisée par des enzymes cytoplasmiques (à l'exception de la thiosulfate deshydrogénase, requise pour l'étape (2), localisée dans le périplasma). L'étape (3) nécessite l'intervention d'hydrolases tandis que l'étape (4) implique des activités adénosine 5'-phosphosulfate réductase ou sulfite : cytochrome c oxydase couplées à une adénosine diphosphate sulfurylase.

trouver sous forme stable en cas de liaison directe d'un atome de S à un atome de C (C-S). C'est le cas par exemple des acides aminés soufrés, des protéines, du glutathion, des coenzymes, des vitamines et d'antibiotiques. Par opposition aux formes stables, les composés organiques de type C-O-S, C-N-S ou C-S-S, sont labiles. Cette fraction labile est presque exclusivement constituée d'esters de sulfate issus de l'action d'un composé acide sur un alcool. Cette fraction serait plus rapidement mobilisable que le S organique stable (Figure II-4A).

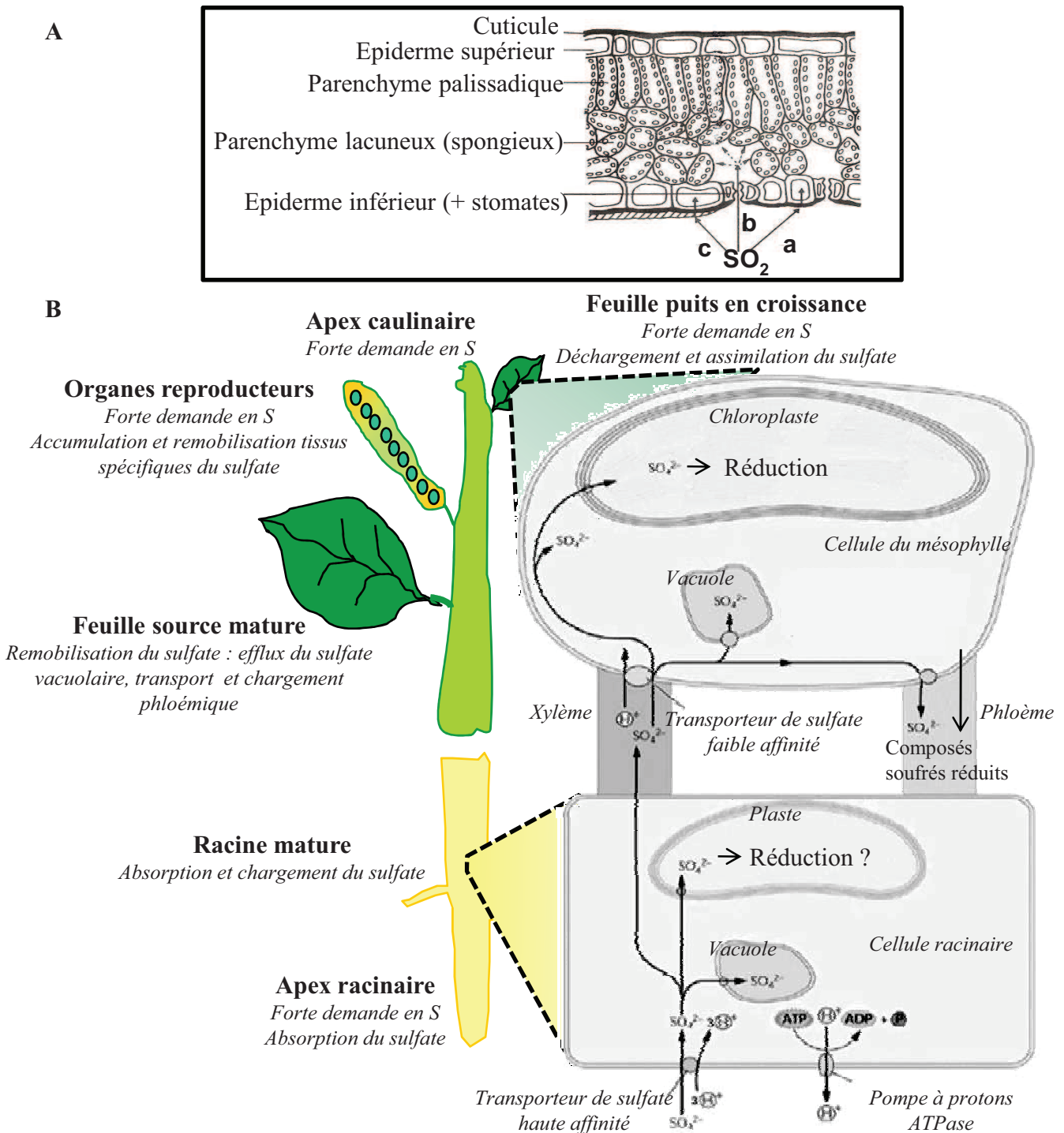
Le S minéral quant à lui se rencontre sous forme de sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) et de composés à niveaux d'oxydation plus faibles tels que le S élémentaire, le sulfure ( $\text{S}^{2-}$ ), les polysulfures, le sulfite ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), le thiosulfate ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ), et le tétrathionate ( $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ ). L'oxydation du S élémentaire et la minéralisation du S organique (par les sulfatases) sont deux processus résultant essentiellement de l'activité biologique (d'origine bactérienne et fongique) et sont par conséquent dépendants de la température, de l'humidité ou encore de la qualité de matière organique (rapport C : N par exemple car si la concentration en azote est élevée l'activité biologique l'est aussi ; Scherer, 2001). Quand le S élémentaire est mélangé au sol, il peut alors être oxydé en sulfate par les microorganismes par une série de réactions décrites dans la Figure II-4B (Niknahad-Gharmakher, 2008).

Dans les sols bien drainés et aérés, la majeure partie du S minéral se présente sous forme de sulfate. La concentration en sulfate est généralement faible en hiver et au printemps du fait d'une lixiviation importante et d'une activité microbienne réduite.

Le soufre du sol n'est donc pas uniquement issu des dépôts atmosphériques, de l'altération de la roche mère, et des processus de minéralisation de la matière organique, mais également de l'eau d'irrigation et de l'application d'engrais soufrés devenue nécessaire pour répondre aux besoins de certaines plantes de grande culture telles que le colza d'hiver (Figure II-2B).

## **II.2 Besoins en soufre et mécanismes d'absorption et d'allocation**

Par rapport à d'autres plantes de grande culture, le colza est particulièrement exigeant en S quels que soient les cultivars utilisés (Figure II-2B ; Studer *et al.*, 1987). Ces auteurs ont mis en évidence une consommation de luxe, ce qui engendre une difficulté à déterminer avec



**Figure II-5 :** **A :** Dépôt de  $SO_2$  sur les feuilles. Les lettres correspondent aux points d'entrées des différents types de dépôts foliaires de S. a : dépôt sec sur la surface des feuilles, b : diffusion par les stomates ; c : dépôt humide sur la surface des feuilles. **B :** Absorption et circulation du sulfate sur l'ensemble de la plante selon le type de tissus considéré lorsque le sulfate ( $SO_4^{2-}$ ) est non limitant (modifiée d'après Buchner et al., 2004).

Le  $SO_4^{2-}$  est absorbé au niveau des racines en symport avec  $3 H^+$ . Le gradient de protons étant maintenu par une pompe  $H^+/ATPase$  plasmalemmique. Le  $SO_4^{2-}$  est ensuite, soit transporté vers les parties aériennes via le xylème, soit stocké au niveau des vacuoles. Le  $SO_4^{2-}$  est déchargé dans les cellules du mésophylle où il est soit stocké, soit réduit. Parmi les composés réduits susceptibles d'être véhiculés via le phloème, le glutathion, les acides aminés soufrés et autres dérivés de la méthionine tels que la S-méthylméthionine (SMM) sont concernés.

précision les besoins réels en S des plantes. Ils suggèrent des exigences moyennes variant de 2,8 à 3,2 kg de S par quintal de graines produites dont la moitié serait fournie par le sol.

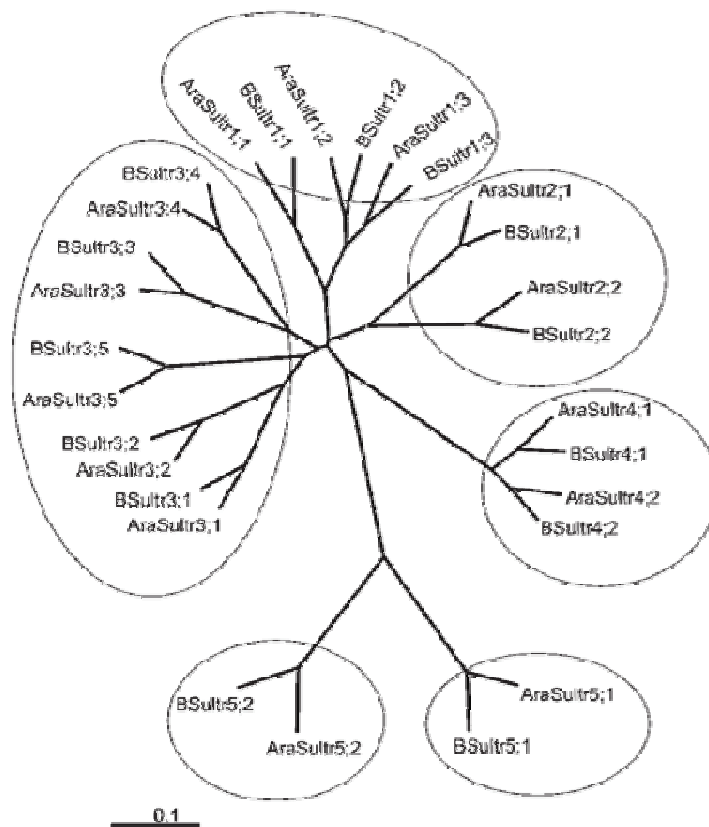
*Les formes de S absorbées :*

Le S est majoritairement prélevé par les plantes par voie racinaire sous forme de sulfate (Figure II-5). Or, le sulfate est un anion particulièrement mobile et les pertes par lixiviation peuvent atteindre 80 kg S.ha<sup>-1</sup>.an<sup>-1</sup> (Studer, 1987). Les plantes peuvent également absorber du S atmosphérique, mais cette voie reste généralement accessoire même si elle n'est quantitativement pas négligeable dans les régions industrielles fortement polluées (Leustek & Saito, 1999). Le S atmosphérique (essentiellement le dioxyde de soufre, SO<sub>2</sub>, mais également l'hydrogène sulfuré, H<sub>2</sub>S, le carbonyl de soufre, COS, et le méthyl captane, CH<sub>3</sub>-SH) peut se déposer sous forme aqueuse (dépôt humide), ou gazeuse (dépôt sec) sur la cuticule, et peut diffuser au travers des stomates (Figure II-5A). Il a été démontré que le SO<sub>2</sub> provenant des pluies acides (SO<sub>2</sub> aqueux) peut être transformé à la surface inférieure de la feuille en SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> capable de diffuser au travers de la cuticule qui a été endommagée par l'acidité des pluies. Néanmoins, les dépôts se font essentiellement par voie stomatique (De Kok *et al.*, 2005). Il intervient une conversion apoplastique du SO<sub>2</sub> dans la paroi des cellules qui bordent la chambre sous-stomatique : le SO<sub>2</sub> réagit avec l'eau pour former du bisulfite, HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Cette réaction non enzymatique est favorisée par l'acidité du pH apoplastique. Très rapidement, le bisulfite est transformé en SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> au niveau de l'apoplaste par une enzyme (Sulfite Oxydase, qui fonctionne comme une peroxydase ; De Kok *et al.*, 2005).

L'exportation importante de S par les végétaux cultivés combinée à la forte diminution des dépôts de S atmosphérique (Figure I-2) engendrent un épuisement progressif en S des sols (Scherer, 2001). Dans ce contexte, l'apport d'engrais soufré est devenu indispensable au maintien d'une disponibilité suffisante en sulfate, forme de S majoritairement absorbée par la plante.

*Les transporteurs de sulfate :*

De nombreux transporteurs de sulfate sont impliqués pour faciliter les multiples étapes de transports transmembranaires, entre l'absorption du sulfate du sol et le déchargement au niveau du site de réduction que constituent les plastes et plus particulièrement, les chloroplastes. Des études physiologiques et biochimiques ont montré que le transport du sulfate à travers la membrane plasmique des cellules racinaires était contrôlé par un système de transport spécifique. En effet, l'absorption du sulfate au niveau racinaire nécessite un transport actif (Leustek & Saito 1999, Hawkesford *et al.*, 1993) faisant intervenir un symport

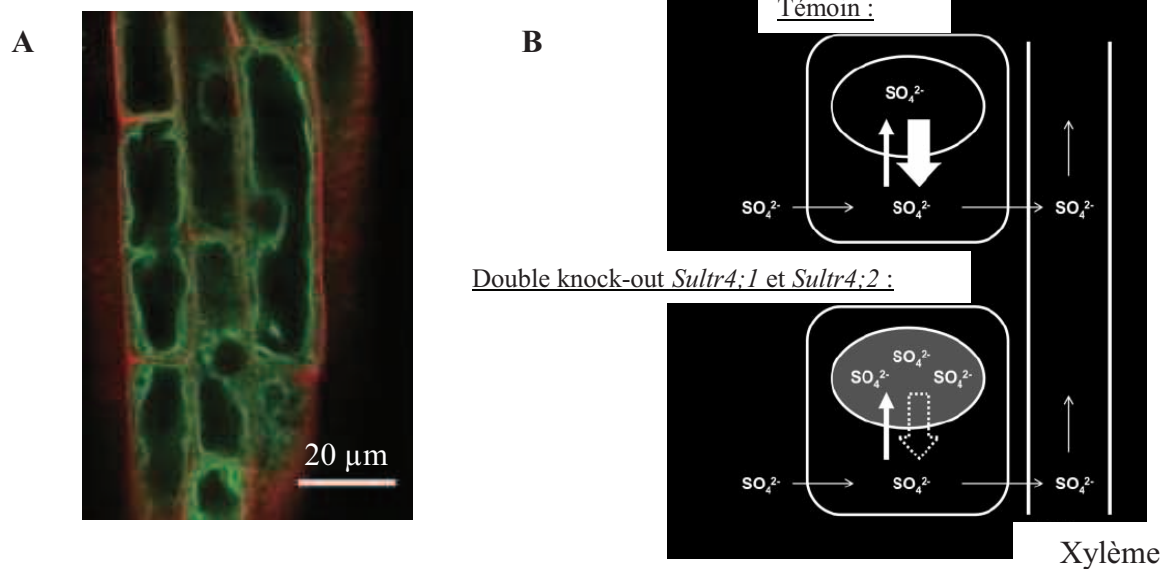


**Figure II-6 :** *Arbre phylogénétique et localisation d'expression des gènes codant des transporteurs de sulfate des Brassicacées proposé par Parmar et al. (2007) par alignement de séquences codantes chez Arabidopsis : AB018695, AB042322, AB049624, AB003591, D85416, 89631, AB004060, AB023423, AB054645, AB061739, B008782, AB052775, AC018848, AC006053; et chez les Brassicacées : AJ416460 (BSultr1;1), AJ311388 (BSultr1;2), AJ633707 (BSultr1;3), AJ633705 (BSultr2;1), AM492198 (BSultr2;2), AJ581745 (BSultr3;1); AJ601439 (BSultr3;2), AJ704373 (BSultr3;3), AJ704374 (BSultr3;4), AJ633706 (BSultr3;5), AJ416461 (BSultr4;1), AJ555124 (BSultr4;2), AJ311389 (BSultr5;1), et BH706670 (un fragment de 748 bp de BSultr5;2).*

(3 H<sup>+</sup> pour 1 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) couplé à une pompe à protons afin de maintenir le gradient de H<sup>+</sup> (Figure II-5B). Les gènes codant des transporteurs et les sites potentiels d'expression de ces gènes sont multiples. Après comparaison de séquences et des degrés de similitudes, un arbre phylogénétique montre que les systèmes de transport mis en jeu sont codés par une même famille de gènes répartis en **5 groupes fonctionnels** distincts chez les brassicacées (Buchner *et al.* 2004b ; Figure II-6). Certains groupes de gènes de transport du sulfate seraient exprimés dans les racines, les parties aériennes ou dans les deux types de tissus. Toutefois, le rôle fonctionnel de certains de ces groupes reste à confirmer. Les données les plus récentes sur chaque groupe fonctionnel sont rapportées ci-après.

- Les transporteurs de sulfate appartenant au **groupe 1** sont les mieux caractérisés : *AtSULTR1;1* et *AtSULTR1;2* sont exprimés majoritairement dans les poils absorbants, les cellules épidermiques et les cellules corticales de racines (Takahashi *et al.*, 2000 ; Vidmar *et al.*, 2000 ; Yoshimoto *et al.*, 2002, 2007 ; El Kassis *et al.*, 2007). Ces transporteurs à haute affinité (K<sub>m</sub> avoisinant les 10 μM, Smith *et al.* 1995, 1997) jouent un rôle dans l'absorption du sulfate du sol. Les transporteurs *AtSULTR1;3* seraient quant à eux impliqués dans le chargement phloémique du sulfate (Yoshimoto *et al.* 2003).
- Le sulfate absorbé est ensuite, soit stocké dans les vacuoles au niveau des racines, soit transporté *via* les vaisseaux conducteurs du xylème vers les feuilles où il est alors assimilé et/ou stocké dans les vacuoles (Figure II-6). Deux gènes appartenant au **groupe 2** (*AtSULTR2;1*, *AtSULTR2;2*) codent des transporteurs de plus faible affinité (K<sub>m</sub> supérieur à 100 μM) qui sont localisés dans les cellules des vaisseaux conducteurs de la sève xylémique (pour *AtSULTR2;1*) et phloémique (pour *AtSULTR2;2*) des racines. Ces 2 transporteurs interviendraient plus spécifiquement dans le transport à longue distance au cours de la translocation du sulfate des organes source aux organes puits (Takahashi *et al.* 2000).
- Les rôles des transporteurs du **groupe 3** n'ont pas encore été totalement élucidés. Chez *Arabidopsis*, *AtSULTR3;1*, *AtSULTR3;2* et *AtSULTR3;3* sont tous trois localisés au niveau foliaire (Takahashi *et al.*, 2000; Hawkesford *et al.*, 2003), tandis que chez *Brassica oleracea*, *BSULTR3;2* est exclusivement exprimé au niveau racinaire et *BSULTR3;3* est retrouvé aux niveaux foliaire, caulinaire et racinaire (Buchner *et al.* 2004b ; Figure II-6). En outre, *BSULTR3;4* et *BSULTR3;5* sont respectivement





**Figure II-7 : A :** Localisation tonoplastique de SULTR4;1 au sein de cellules épidermiques de l'apex racinaire d'*Arabidopsis*, observée en microscopie confocale par Kataoka et al. (2004). Cette protéine est révélée par fluorescence verte de la protéine de fusion SULTR4;1-GFP. La fluorescence rouge est obtenue par révélation des parois cellulaires à l'iodure de propidium.

**B :** Modèle hypothétique des rôles des transporteurs de sulfate vacuolaires du groupe 4 chez les plantes vasculaires, d'après Kataoka et al. (2004).

Le sulfate accumulé dans la vacuole peut être libéré par SULTR4;1 et SULTR4;2 et peut ensuite entrer dans le flux de xylème. L'accumulation de sulfate dans les racines de double knock-out SULTR4;1 et SULTR4;2 suggère une contribution significative de la fonction assurée par les transporteurs SULTR4 dans la libération du sulfate de la vacuole vers le cytoplasme. Ce mécanisme, qui peut réguler la libération et la capture du sulfate via le tonoplaste dans les cellules du parenchyme xylémien, est obtenu par modulation de l'expression de transporteurs SULTR4 en réponse au niveau de disponibilité en sulfate. L'efflux actif de sulfate de la vacuole contribue à maintenir le flux de la voie symplastique, particulièrement dans des conditions limitantes en S. En revanche, l'approvisionnement excessif de sulfate sera tamponné par un influx dépendant du potentiel hydrique vers la vacuole avant d'être chargé dans les vaisseaux du xylème.

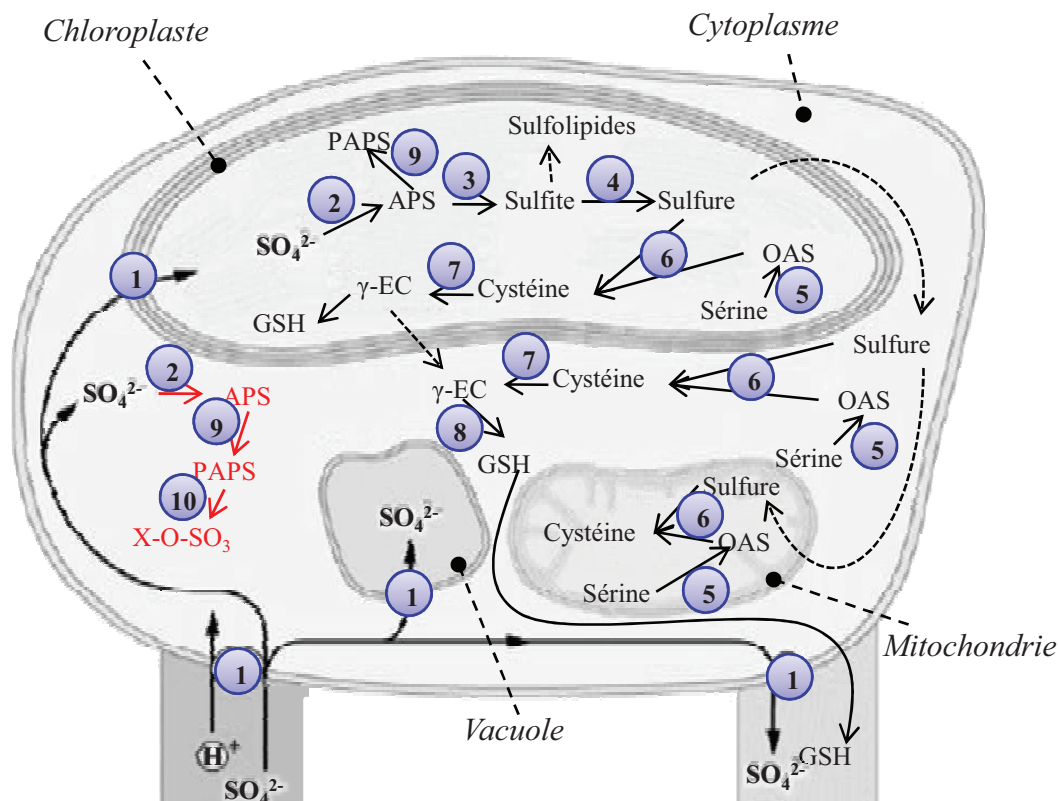
exprimés chez *Brassica oleracea* aux niveaux caulinaire et racinaire (Buchner *et al.*, 2004a).

- L'identification des transporteurs impliqués dans le recyclage du sulfate vacuolaire a été effectuée par Kataoka *et al.* (2004). Ces transporteurs appartiennent au **groupe 4** (*AtSULTR4;1* et *AtSULTR4;2*) et sont localisés au niveau du tonoplaste des cellules du péricycle, du parenchyme xylémique des racines et des cotylédons. Ils sont responsables de l'efflux de sulfate de la vacuole (Figure II-7).
- Le **5<sup>ème</sup> groupe** de transporteurs de sulfate correspond au groupe dont les séquences nucléotidiques diffèrent le plus des autres transporteurs identifiés. Chez *Brassica napus*, *BnSULTR5;1* est présent au niveau tonoplastique dans les racines, les tiges et les feuilles. Bien que la fonction cellulaire des transporteurs du groupe 5 soit à ce jour inconnue, leur intervention dans l'influx de sulfate vacuolaire est fortement suspectée (Hawkesford *et al.* 2003; Parmar *et al.* 2007). Cette hypothèse n'exclut pas que cette famille de transporteurs puisse être impliquée dans le transport d'autres éléments. Par exemple, chez *Arabidopsis*, *AtSULTR5;2* serait impliqué dans le transport haute affinité du molybdène et, de ce fait, a été renommé MOT1 pour Molybden Transporter 1 (Tomatsu *et al.* 2007; Baxter *et al.*, 2008).

### II.3 Assimilation du soufre dans la plante

Lors d'une acquisition foliaire de S atmosphérique (SO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>S, De kok *et al.*, 2005), les composés gazeux peuvent être rapidement dissous dans l'apoplaste des feuilles, et intégrer la voie d'assimilation du sulfate suite à des étapes d'oxydation et de transport encore méconnues. L'acquisition du H<sub>2</sub>S par *Brassica oleracea* est négligeable en conditions non limitantes en sulfate mais peut permettre une légère augmentation de S endogène dans le cas d'une privation en sulfate (Buchner *et al.*, 2004a). Van Der Kooij *et al.* (1997) ont montré chez *Arabidopsis* une forte tolérance à des concentrations élevées en SO<sub>2</sub> (de 89 à 706 nL.L<sup>-1</sup>) accompagnée d'une accumulation de sulfate endogène, mais celui-ci n'est que très peu réduit en substances organiques.

Chez le colza, le prélèvement, la distribution et l'assimilation du S dépendent de la quantité de sulfate assimilable mis à disposition au niveau du sol. Une fois le sulfate absorbé,



**Figure II-8 :** Transport et voies d'assimilation réductrice/non réductrice du sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) dans la cellule végétale, d'après Kopriva, 2006.

La voie d'assimilation non réductrice est représentée par les flèches rouges et la voie réductrice est illustrée en noir. Selon Leustek & Saito (1999), il existerait une voie d'assimilation réductrice supplémentaire appelée « Carrier bound pathway » intervenant au niveau du sulfite qui serait liée au groupement thiol d'un transporteur non caractérisé à ce jour. Les molécules impliquées dans l'assimilation du  $\text{SO}_4^{2-}$  sont : **Acétyl CoA** : Acétyl Co-enzyme A, **APS** : Adénosine 5'-phosphosulfate, **GSH** : glutathion sous forme réduite, **Met** : méthionine, **OAS** : O-acétylsérine, **PAPS** : 3'-phospho-5'-adénylsulfate, **S<sup>2-</sup>** : sulfure, **SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>** : sulfite. Les flèches en pointillés indiquent des étapes de transport hypothétiques.

#### Principales protéines impliquées :

- ① **Transporteur de sulfate**
- ② **ATP sulfurylase**
- ③ **APS réductase (sulfotransférase)**
- ④ **Sulfite réductase**
- ⑤ **Sérine-acétyl-transférase**
- ⑥ **O-acétylsérine thiol-lyase**
- ⑦ **glutamylcystéine synthétase ( $\gamma$ -ECS)**
- ⑧ **glutathion synthétase**
- ⑨ **APS kinase**
- ⑩ **Sulfotransférase**

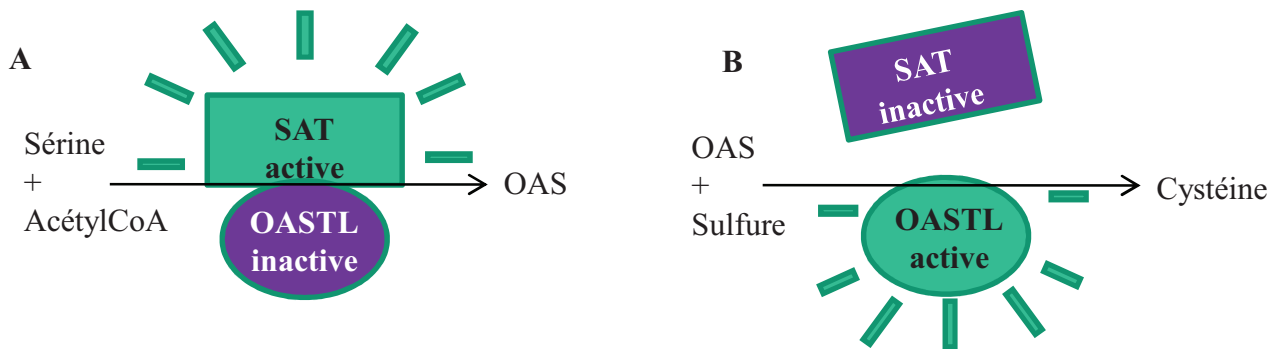
son assimilation est essentielle à la synthèse de nombreuses molécules clés du métabolisme de la plante telles que les acides aminés soufrés (Figure II-3).

Chez le colza, les principales molécules soufrées observées dans une jeune feuille sont par ordre d'importance : les protéines (50%), le  $\text{SO}_4^{2-}$  (42%), les glucosinolates (6%) et le glutathion (2%). Ces proportions peuvent néanmoins varier en fonction du niveau de disponibilité en S et en N minéraux (Buchner *et al.*, 2004b), du stade de développement de la plante, mais également de l'âge de l'organe considéré. Ainsi les vieilles feuilles contiennent jusqu'à 90% de  $\text{SO}_4^{2-}$  (Blake-Kalff *et al.*, 1998) contre seulement 42% dans une jeune feuille.

L'assimilation du sulfate peut être effectuée selon deux voies (Figure II-8) :

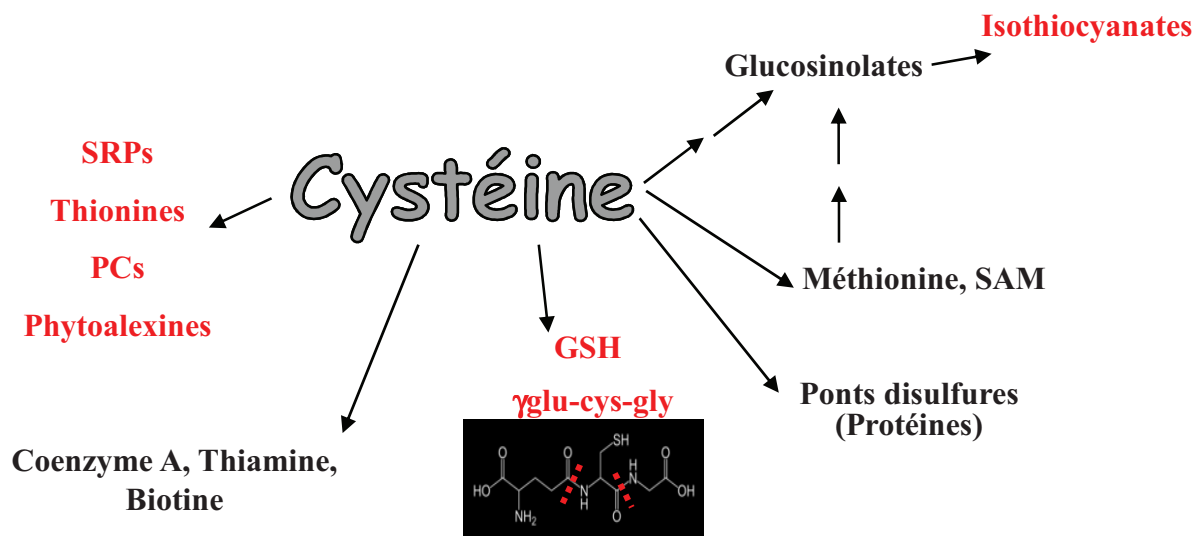
- **la voie d'assimilation non réductrice** (Figure II-8, flèches rouges) : essentiellement cytosolique, cette voie conduit à la synthèse de 3'-phospho-5'-adénylsulfate (PAPS), précurseur de la synthèse des flavonoïdes (De Kok *et al.*, 2005).
- **la voie d'assimilation réductrice** (Figure II-8) : bien que les racines contiennent toutes les enzymes de la voie d'assimilation réductrice du sulfate au niveau plastidial, la majeure partie du sulfate est réduit dans les chloroplastes et/ou en partie dans les mitochondries des tissus aériens (Suter *et al.*, 2000 ; Weber *et al.*, 2000 ; Droux 2004 ; Saito 2004). Dans un premier temps, le sulfate est activé en adénosine 5' phosphosulfate (APS) par adénylation dans une réaction catalysée par l'ATP sulfurylase (ATPS, EC 2.7.7.4). L'APS est réduit en sulfite par l'APS réductase (APR; EC 1.8.4.9). Le sulfite est à son tour réduit par la sulfite réductase ferrédoxine-dépendante (SIR; EC 1.8.7.1). Le S est ensuite intégré par l'O-acétylsérine (thiol) lyase (OAS-TL; EC 2.5.1.47) à l'O-acétylsérine (OAS) pour former la cystéine (Figure II-9). L'OAS est synthétisée par acétylation de la sérine avec acétyl-CoenzymeA catalysée par la sérine acétyltransférase (SAT; EC 2.3.1.30) (Leustek *et al.*, 2000; Suter *et al.*, 2000;) (Figure II-9). L'OAS-TL est présente en excès par rapport à la SAT.

La cystéine se situe à un carrefour entre les métabolismes du C (fournissant l'acétylCoA), du N (fournissant la sérine) et du S (apport de soufre). Cet acide aminé va également servir de précurseur à la synthèse de tous les composés soufrés issus des métabolismes primaire et secondaire. Parmi ces composés, certaines molécules sont caractéristiques des Brassicacées (glucosinolates et isothiocyanates) et jouent un rôle essentiel dans la défense de la plante contre les agressions extérieures (molécules SDC pour « Sulfur-containing Defense



**Figure II-9 :** Schéma de l'activité Sérine-acétyl-transférase, SAT (A) et O-acétylsérine thiolase, OAS-TL (B) (adaptée de Hesse et al., 2004).

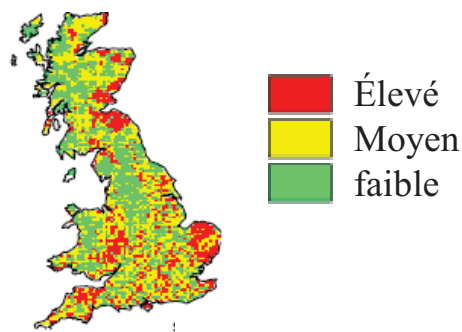
Le ratio SAT/OAS-TL=1/400. Il a été suggéré que les enzymes SAT et OAS-TL ne soient pas fonctionnelles de façon simultanée. Lorsque le complexe SAT/OAS-TL se forme, l'OAS-TL devient inactive. La présence de niveaux élevés en OAS peut perturber ce complexe et limiter la synthèse d'OAS en rendant la SAT inactive (Droux, 2004). La séparation de ce complexe permet à l'OAS-TL de retrouver son activité. L'OAS est ensuite métabolisée en cystéine grâce à l'OAS-TL active et au sulfure provenant du métabolisme soufré.



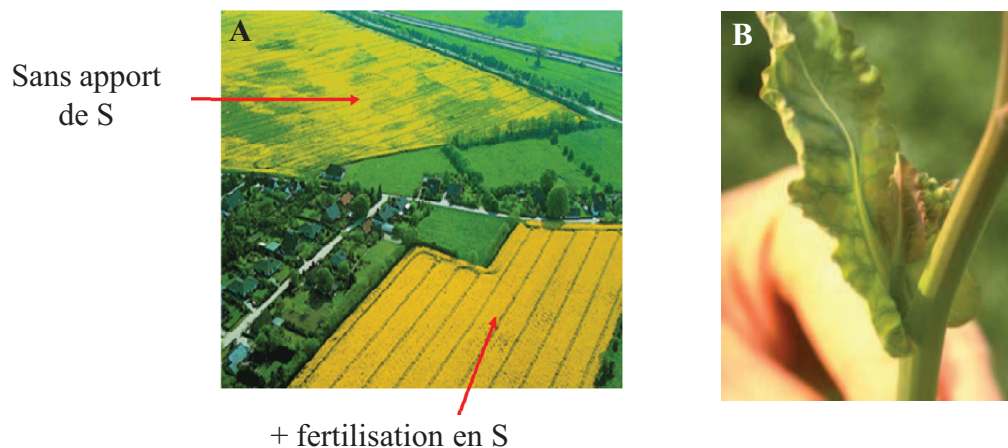
**Figure II-10 :** Rôle central de la cystéine dans le métabolisme soufré.

La cystéine, produit final de l'assimilation réductrice du S est le précurseur de nombreuses molécules SDC (sulfur-containing defense compounds) représentées en rouge. Les PCs (phytochélatines), le GSH (glutathion sous forme réduite) protègent les organites en cas de stress abiotiques et participent aux mécanismes de détoxification de la cellule. Les thionines sont des polypeptides constitués de 45 à 48 acides aminés, dont 6 à 8 cystéines formant 3 à 4 ponts disulfures. Les glucosinolates, molécules à 2 ou 3 atomes de S, peuvent être convertis sous l'action de thioglucosidases en nitrile et isothiocyanate (entre autres), composés de défense contre les pathogènes. Les SRPs (Sulfur-Rich Proteins) possèdent des ponts disulfures. Certaines sont constitutives, d'autres inducibles par les attaques pathogènes. Les phytoalexines telles que la brassinine et la camalexine sont induites par un stress biotique ou abiotique. La cystéine est également le précurseur de la synthèse du Coenzyme A (nécessaire au métabolisme respiratoire) et de la méthionine, acide aminé initiateur de la traduction et précurseur du S-adenosylméthionine (SAM), molécule intervenant dans le voie de synthèse de l'éthylène. En outre, la cystéine permet la formation des ponts disulfures inter et intra protéiques, essentiels à la mise en conformation et à l'activité de certaines protéines.

Compounds », Figure II-10, Rausch & Wachter, 2005). La génération des précurseurs de composés soufrés nécessaires à la croissance et à la défense de la plante fait également intervenir d'autres voies métaboliques (carbonée et azotée). Lorsque ces autres voies sont affectées, la synthèse de formes réduites circulantes telles que le GSH et les phytochélatines, impliquées dans les processus de détoxification des radicaux libres et des métaux lourds, peut alors être modulée (Kopriva & Rennenberg, 2004).



**Figure II-11 :** Cartographie des zones à risque de déficience en soufre en fonction des retombées atmosphériques (source : Institute of Arable Crops Research - Rothamstead). Cette carte sert de base à la préconisation locale de la fertilisation soufrée pour la culture de blé en Grande Bretagne, en fonction des retombées atmosphériques en 2002 et des besoins estimés de cette culture.



**Figure II-12 :** Conséquences agronomiques d'une faible disponibilité en S sur le colza d'hiver.

**A :** photographie illustrant un champ sans apport de fertilisant soufré présentant les signes d'insuffisance en S par opposition à un champ correctement fertilisé (source : Dr. H. Hesse, International Workshop Crosstalks between Metabolic Pathways involving Sulphur in Plants Inst. Für Pflanzenernährung & Bodenkunde (FAL), October 21-23, 2005, Braunschweig, Germany Molecular). **B :** photographie de feuilles jeunes présentant les signes de chlorose et de pigmentation anthocyannique caractéristiques d'une carence en S (source : Haneklaus et al., Institute of Plant Nutrition and Soil Science, FAL, Braunschweig; <http://www.pb.fal.de>).

### III. REPONSES DE LA PLANTE A UNE LIMITATION EN S

Au cours des dernières décennies les progrès considérables réalisés dans la réduction des émissions de S dans l'atmosphère ont abouti à une diminution des dépôts atmosphériques de S sur les terres agricoles (McGrath *et al.*, 1996, Figure I-2). Des travaux de modélisations prévoient une augmentation de l'apparition de terres agricoles présentant des risques d'appauvrissements en S, modifiant ainsi les pratiques culturales (Hawkesford, 2000). Ces modèles sont essentiellement basés sur les dépôts atmosphériques de S, les caractéristiques des sols et les besoins en S des plantes de grande culture telles que le blé. Ils sont utilisés à grande échelle pour l'estimation des zones à hauts risques de carence en S, comme celles de la Grande Bretagne (Figure II-11).

Compte tenu de l'exigence en S des plantes telles que le colza (Figure II-2B), la compréhension des effets d'une limitation en S minéral constitue un prérequis pour répondre à l'objectif d'amélioration de l'efficacité d'utilisation du S.

#### III.1 Au niveau agronomique

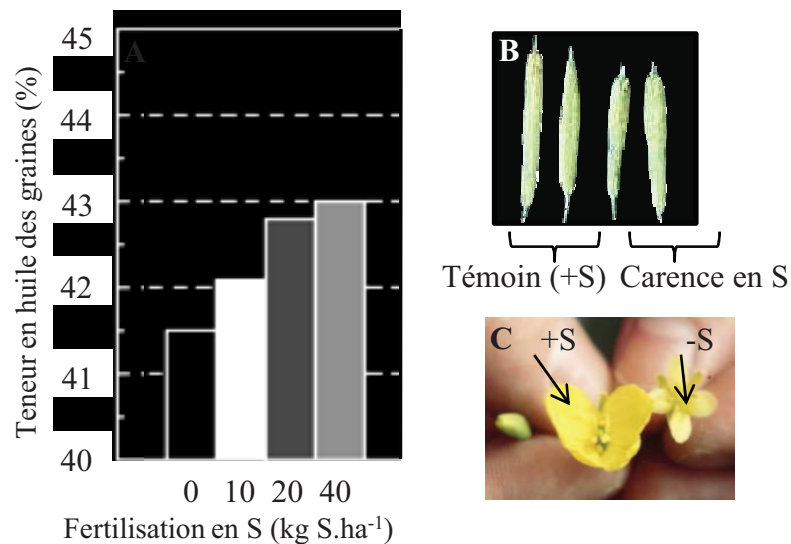
Dans le cas d'une déficience (faible limitation) en S, aucune différence morphologique par rapport aux plantes témoin n'est observée mais le rendement et la qualité des graines sont altérés (Scherer, 2001). Les effets d'une faible disponibilité en S se manifestent surtout sur la croissance des tissus reproducteurs (Mc Grath & Zhao, 1996, Figure II-12A). Contrairement au N, l'apport de S a davantage pour effet d'augmenter le pourcentage de survie des siliques que d'en augmenter le nombre potentiel. Une limitation en S peut en effet conduire à un accroissement des avortements des siliques (source : CETIOM<sup>1</sup>). Ainsi, l'application d'une fertilisation soufrée adéquate permet d'augmenter le rendement grainier.

En cas de carence (limitation sévère) en S au début de la montaison, les jeunes feuilles sont atteintes de chlorose principalement entre les nervures (Figure II-12B, Haneklaus *et al.*, 2005). Les organes reproducteurs étant élaborés à partir d'assimilats récemment acquis (ou précédemment accumulés) toute limitation qui surviendrait pendant le stade végétatif peut

---

<sup>1</sup> [www.cetiom.fr](http://www.cetiom.fr)





**Figure II-13 :** Conséquences agronomiques d'une faible disponibilité en S sur le colza d'hiver.

**A :** Effet de différents niveaux de fertilisation en S sur la teneur en huile des graines de colza d'hiver pour un apport de 180 kg N. ha<sup>-1</sup> (adaptée de McGrath et Zhao, 1996). **B :** photographie de siliques issues de plantes carencées en S (à droite) par opposition aux siliques de plantes non carencées en S (+S, à gauche) (source : CETIOM<sup>1</sup>). **C :** photographie illustrant une fleur de colza aux couleurs et morphologies caractéristiques d'une carence en S (-S, à droite) par opposition à une fleur de plante non carencée en S (+S, à gauche) (source : Haneklaus et al., Institute of Plant Nutrition and Soil Science, FAL, Braunschweig; <http://www.pb.fal.de>).

alors affecter la composition protéique et lipidique (Nikiforova *et al.*, 2005) et donc la qualité nutritionnelle des graines (Fismes-Bemer, 1998). A titre d'exemple, chez *Brassica junca*, la carence en S a un impact direct sur la qualité grainière en réduisant fortement leur teneur en protéines et en huile des graines (-6% de MS par rapport aux plantes témoins ; Ahmad & Abdin, 2000a). La teneur en huile des graines de colza peut passer de 43 à 41,5 % en l'absence de fertilisation soufrée (Figure II-13A, McGrath & Zhao, 1996)

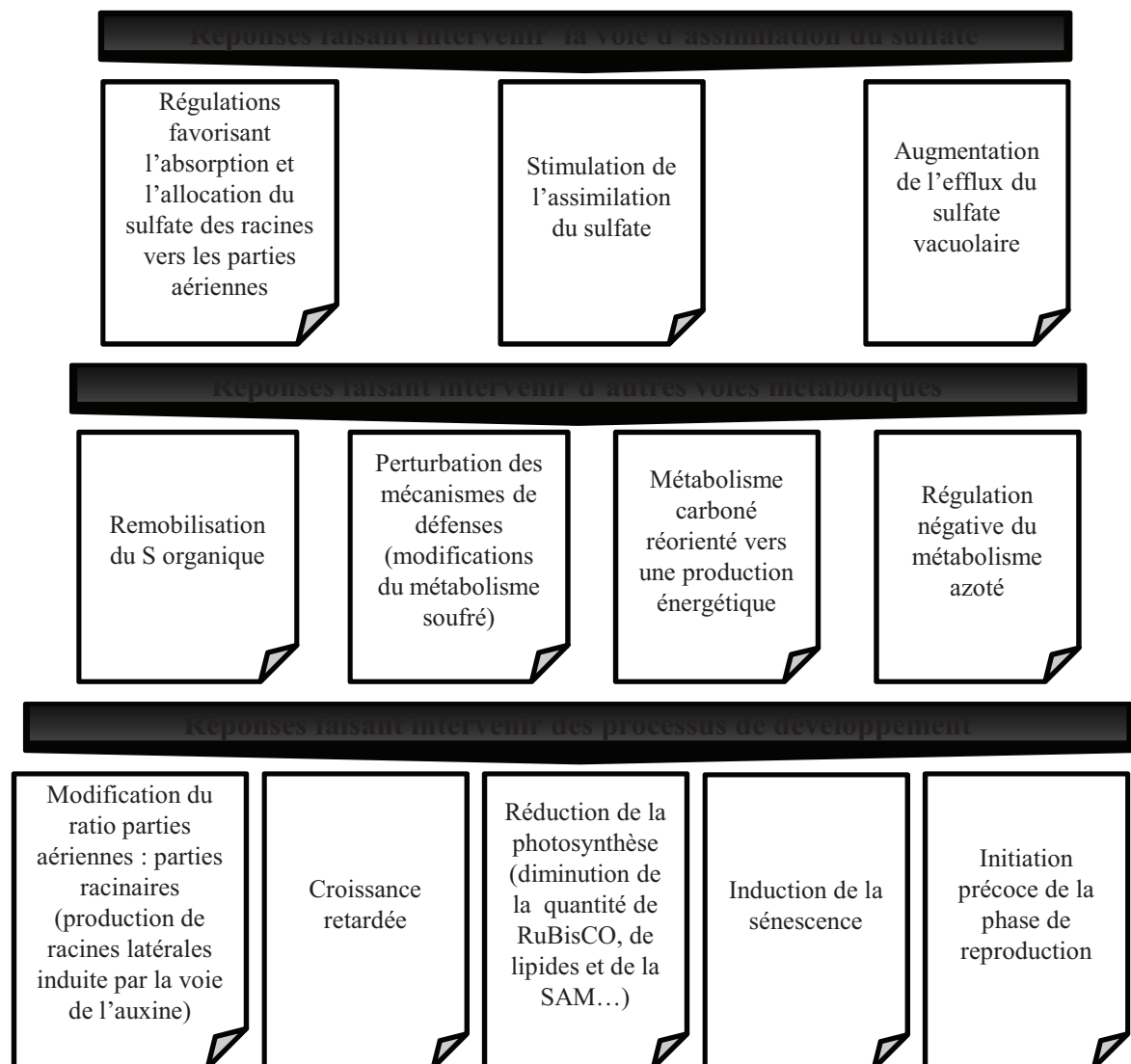
L'intérêt alimentaire des protéines des tourteaux de colza réside entre autre dans leur richesse en acides aminés soufrés « essentiels ». En effet, les acides aminés qualifiés d'« essentiels » sont très important dans la ration alimentaire des animaux monogastriques (porc, volailles) dans la mesure où ces acides aminés ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme de ces animaux. Une limitation en S exogène peut, par conséquent, réduire la qualité nutritionnelle des tourteaux de colza.

La graine de colza est également une source d'acides gras essentiels. Son huile comporte un très bon profil en acides gras pour l'alimentation humaine (Figure II-1A). Dans le cas d'une carence en S, la proportion des acides gras, bien que génétiquement contrôlée, peut être considérablement altérée en faveur d'acides gras indésirables à longues chaînes (acides érucique et éicosénoïque) tandis que la proportion des acides oléique et linoléique diminue (Ahmad & Abdin, 2000a).

Chez le colza de variété Rafal, le rendement grainier peut passer de  $23,6 \pm 0,37$  q.ha<sup>-1</sup> en l'absence de fertilisation à  $39,5 \pm 0,37$  q.ha<sup>-1</sup> suite à un apport de 32 kg.ha<sup>-1</sup> (Walker & Booth dans Abrol & Ahmad, 2003). Une limitation en S peut avoir de lourdes conséquences agronomiques en réduisant le nombre et la taille des siliques (source : CETIOM<sup>1</sup>, Figure II-13B). La baisse de rendement grainier observée dans le cas d'une fertilisation insuffisante pourrait également être liée à des résistances amoindries face aux attaques d'agents pathogènes fongiques chez le colza (Bloem *et al.*, 2004). Haneklaus & Schnug (1994) estiment en effet qu'une restriction en S pourrait abaisser les résistances naturelles des plantes aux stress abiotiques et biotiques. A titre d'exemple, les mécanismes de résistance du colza à *Pyrenopeziza brassicae* (responsable de la cylindrosporiose) semblent faire intervenir une émission d'H<sub>2</sub>S issu de la dégradation de la cystéine par la L-cystéine désulphydrase (LCD) dont l'activité est augmentée en réponse à l'infection fongique (Bloem *et al.*, 2004).

---

<sup>1</sup> www.cetiom.fr



**Figure II-14** : *Modèle hypothétique de hiérarchisation des séquences d'évènements physiologiques intervenant au sein d'une plante carencée en S. Ce modèle a été élaboré à partir des différents modèles proposés par Hawkesford & De Kok (2006), Hoefgen & Nikiforova (2008) et Lewandowska & Sirko (2008).*

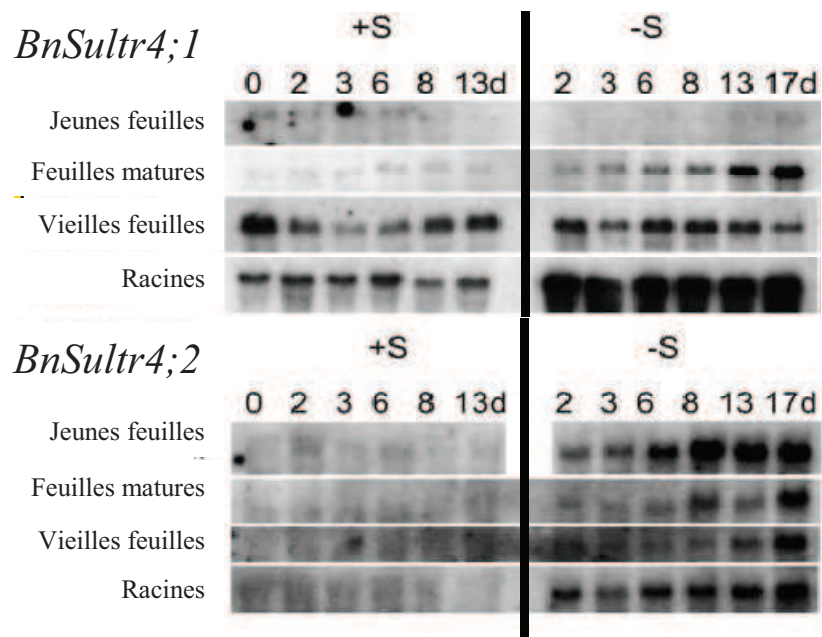
Outre le niveau de disponibilité en S, la sévérité d'une carence en S semble dépendre de l'occurrence de la limitation en S au cours du cycle de développement (Haneklaus *et al.*, 2005). Ainsi, une carence en S qui survient avant la floraison peut amoindrir l'attractivité des fleurs de colza pour les abeilles du fait notamment d'une modification morphologique caractéristique des pétales (taille réduite et couleur plus pâle, Haneklaus *et al.*, 2005 ; Figure II-13C).

### III.2 Au niveau physiologique

Suite à une faible disponibilité en S, la perception d'une carence en S (dont les lourdes conséquences agronomiques ont été présentées § III.1) fait intervenir une cascade de réactions au sein de la plante (Figure II-14) aboutissant à de nombreuses réponses physiologiques. La réduction de la disponibilité en S provoque des modifications métaboliques et transcriptomiques (Figure II-14) ayant des répercussions sur les métabolismes S, C et N (cf. § III.3).

Les réponses physiologiques à une carence en S peuvent être hiérarchisées en trois niveaux tels que présentés dans la Figure II-14.

➤ Un premier niveau de réponses concerne la voie d'acquisition du sulfate et son allocation. En réponse à une limitation, les capacités d'absorption et d'assimilation du sulfate sont rapidement augmentées (Koralewska *et al.*, 2009) tandis que le  $\text{SO}_4^{2-}$  vacuolaire préalablement stocké est remobilisé (Blake-Kalff *et al.*, 1998, Parmar *et al.*, 2007) (Figure II-14). Le sulfate représente la forme majeure de S potentiellement mobilisable (Blake-Kalff *et al.*, 1998, Scherer, 2001, Matula & Pechová, 2002). Le colza semble présenter une forte capacité de stockage mais une faible efficacité de mobilisation du S en conditions non limitantes (Blake-Kalff *et al.*, 1998, Hawkesford, 2000). Les phénomènes de remobilisation du S endogène sont particulièrement importants au moment de la production de graines et nécessitent l'induction de nombreux systèmes de transport (Figure II-15 cf § III.3). La carence entraînerait chronologiquement la mobilisation du sulfate vacuolaire stocké dans les racines (Prosser *et al.*, 2001), les feuilles matures (ou en cours de maturation) et enfin dans les vieilles feuilles.



**Figure II-15 :** Niveaux d'expression (northern blots) des transporteurs de sulfate vacuolaires dans différents organes de colza soumis (S) ou non (+S) à une privation en S (Parmar et al., 2007).

➤ Le deuxième niveau de réponse fait intervenir d'autres voies métaboliques de l'azote et du carbone (décrites dans le § III.3) réorientées vers une remobilisation de composés soufrés organiques et/ou vers une production d'énergie (Nikiforova *et al.*, 2005). Par ailleurs, les capacités de résistance aux maladies fongiques sont amoindries du fait d'une baisse des teneurs en composés soufrés généralement synthétisés en réponse à une attaque pathogène (Rausch & Wachter, 2005, Bloem *et al.*, 2004).

➤ Le troisième et dernier niveau de réponse à une carence en S se manifeste au niveau physiologique par une baisse de la transpiration et par la fermeture des stomates aboutissant à une réduction de l'assimilation du CO<sub>2</sub> et une chute de la conductance hydraulique (Karmoker *et al.*, 1991). Les perturbations physiologiques des capacités photosynthétiques (Ahmad & Abdin, 2000b) vont provoquer des modifications majeures du métabolisme carboné qui seront décrites dans le chapitre § III.3.

D'après Hoefgen & Nikiforova (2008) et Lewandowska & Sirko (2008), la prolifération racinaire ferait également partie des réponses physiologiques à une carence en S (Figure II-14). Il s'agit d'une réponse à la carence en S corroborée par des études transcriptomiques menées chez *Arabidopsis* (Nikiforova *et al.*, 2005 ; Kutz *et al.*, 2002). Cette adaptation morphologique porte à controverses (Dan *et al.*, 2007, Koralewska *et al.*, 2007, Parmar *et al.*, 2007). Une baisse du rapport massique « parties aériennes : parties racinaires » est observée chez *Brassica oleracea* (De kok, 2005 ; Koralewska *et al.*, 2007) et *Brassica napus* (Parmar *et al.*, 2007) en conditions de carence sévère, mais ceci est majoritairement dû à une diminution de la croissance des parties aériennes.

Enfin, parmi les réponses possibles à une carence en S, une induction de la sénescence foliaire (Hawkesford & De Kok, 2006) suivie d'une initiation précoce de la phase de reproduction faisant suite à un déclin trop important de l'assimilation soufrée, azotée et carbonée est proposée par Hoefgen & Nikiforova en 2008. Ces phénomènes se manifesteraient chez les plantes à fleurs lorsque les besoins en S pour les organes en croissance n'ont pu être compensés ni par remobilisation endogène ni par acquisition de sulfate. Néanmoins, ces réponses hypothétiques ont été déduites d'analyses transcriptomiques et métabolomiques réalisées chez *Arabidopsis* (Nikiforova *et al.*, 2005, Tableau II-3) et n'ont

**Tableau II-3 :** Liste non exhaustive des gènes dont l'expression varie en réponse à une carence en S (-S) chez *Arabidopsis thaliana* par rapport à une situation « +S ». **A :** Gènes impliqués directement dans les premières étapes de la voie d'acquisition du sulfate, **B :** quelques autres gènes parmi les plus répondants à une carence en S. Les variations positives et négatives de l'expression des gènes en réponse à une carence en S (-S) par rapport à une situation contrôle (+S) sont respectivement représentées par un signe « + » et par un signe « - ».

<b>A</b>	<b>Fonction des protéines codées par les gènes</b>	<b>Locus des gènes</b>	<b>Expression en situation "-S"</b>	<b>Références</b>
	transporteur de sulfate SULTR1;1	At4g08620	+	Yoshimoto <i>et al.</i> , 2002, Maruyama-Nakashita <i>et al.</i> , 2003 & 2006
	transporteur de sulfate SULTR2;1	At5g10180	+	Maruyama-Nakashita <i>et al.</i> , 2003, Nikiiforova <i>et al.</i> , 2003
	transporteur de sulfate SULTR3;4	At3g15990	+	Maruyama-Nakashita <i>et al.</i> , 2006
	transporteur de sulfate SULTR4;1	At5g13550	+	Nikiiforova <i>et al.</i> , 2003
	5'adenylsulfate réductase APR2	At1g62180	+	Maruyama-Nakashita <i>et al.</i> , 2003, Hirai <i>et al.</i> , 2003
	sérine O-acétyltransférase putative SAT-106 (Serat3;1)	At2g17640	+	Maruyama-Nakashita <i>et al.</i> , 2006
	glutathion transférase	At1g02920	+	Nikiiforova <i>et al.</i> , 2003
	5'adenylsulfate réductase APR3, PRH26	At4g21990	+	Hirai <i>et al.</i> , 2003
	stéroïde sulfotransférase putative	At4g26280	-	Maruyama-Nakashita <i>et al.</i> , 2003
	glutathion S-transférase putative	At1g78370	-	Maruyama-Nakashita <i>et al.</i> , 2006

<b>B</b>	<b>Fonction des protéines codées par les gènes</b>	<b>Locus des gènes</b>	<b>Expression en situation "-S"</b>	<b>Références</b>
	NADPH oxidoréductase putative, Isoflavonoïde réductase putative	At1g75280	+	Maruyama-Nakashita <i>et al.</i> , 2003 & 2006, Nikiiforova <i>et al.</i> , 2003
	facteur de transport putatif de ribosome A	At4g34730	+	Maruyama-Nakashita <i>et al.</i> , 2003
	thioglucosidase putative	At2g44460	+	Maruyama-Nakashita <i>et al.</i> , 2003 & 2006
	cytochrome P450 CYP81D6	AT2g23220	+	Maruyama-Nakashita <i>et al.</i> , 2003 & 2006
	thioglucosidase putative	At3g60140	+	Maruyama-Nakashita <i>et al.</i> , 2003
	12-oxophytodiénoate réductase OPR1	At1g76680	+	Maruyama-Nakashita <i>et al.</i> , 2003, Nikiiforova <i>et al.</i> , 2003
	méthionine sulfoxide réductase putative	At4g04830	+	Maruyama-Nakashita <i>et al.</i> , 2003
	facteur de transcription MYB41	At4g28110	+	Maruyama-Nakashita <i>et al.</i> , 2003
	lipoxygénase AtLOX2	At3g45140	+	Maruyama-Nakashita <i>et al.</i> , 2003
	transporteur de sucres putatif	At2g05400	+	Maruyama-Nakashita <i>et al.</i> , 2006, Nikiiforova <i>et al.</i> , 2003
	sérine hydroxyméthyltransférase putative	At2g06230	+	Nikiiforova <i>et al.</i> , 2003
	transporteur de myrosinase, inducible par l'acide jasmonique	At1g58160	+	Nikiiforova <i>et al.</i> , 2003
	déhydroascorbate réductase GSH-dépendante	At1g75270	+	Nikiiforova <i>et al.</i> , 2003
	glutathion réductase cytosolique	At3g24170	+	Nikiiforova <i>et al.</i> , 2003
	glycine hydroxyméthyltransférase putative	At1g36370	+	Nikiiforova <i>et al.</i> , 2006
	glucosyl hydrolase, famille 10	At4g38650	-	Maruyama-Nakashita <i>et al.</i> , 2003
	cytochrome P450 CYP79B3	At2g22330	-	Maruyama-Nakashita <i>et al.</i> , 2003 & 2006
	cytochrome P450 CYP83B1	At4g31500	-	Maruyama-Nakashita <i>et al.</i> , 2006
	cytochrome P450 CYP79B2	At4g39950	-	Maruyama-Nakashita <i>et al.</i> , 2006
	méthyl(thio)alkylmalate synthase MAM1	At5g23020	-	Maruyama-Nakashita <i>et al.</i> , 2006
	méthyl(thio)alkylmalate synthase MAML	At5g23010	-	Maruyama-Nakashita <i>et al.</i> , 2006
	aminotransférase de chaînes d'acides aminés BCAT	At3g19710	-	Maruyama-Nakashita <i>et al.</i> , 2006

pas été corroborées par des études physiologiques ou par des observations chez d'autres Brassicacées.

Selon le niveau de limitation en S, les réponses physiologiques sont donc plus ou moins complexes. L'efficacité de remobilisation du S endogène peut suffire à couvrir une limitation transitoire (Figure II-14). En revanche, une carence longue et sévère est susceptible de provoquer des perturbations de mécanismes de développement (Figure II-14). L'ensemble de ces réponses physiologiques résulte de régulations complexes des métabolismes soufré, carboné et azoté.

### III.3 Modifications métaboliques

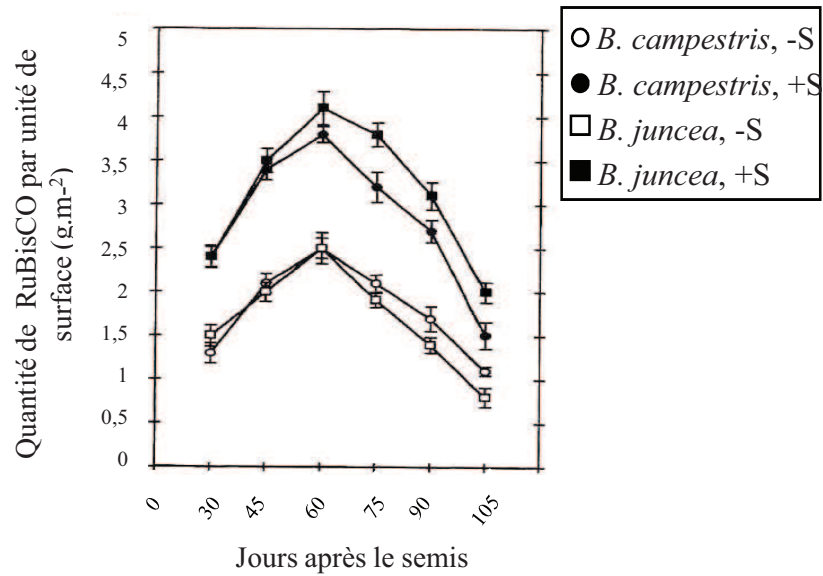
Les perturbations métaboliques observées en réponse à une limitation en S sont elles-mêmes étroitement liées à des modifications enzymatiques résultant ou non de régulations transcriptomiques (Tableaux II-3 A et B). Environ 825 gènes associés spécifiquement à la carence en S auraient une expression significativement différente par rapport aux plantes cultivées sur un milieu non limitant (Nikiforova *et al.*, 2004).

L'ensemble des réactions communément admises en réponse à une carence en S positionnent les perturbations métaboliques soufrées, carbonées et azotées au cœur des réponses physiologiques observées (Figure II-14).

#### *Métabolisme soufré*

Une diminution de la disponibilité en  $\text{SO}_4^{2-}$  du sol provoque une baisse des teneurs en  $\text{SO}_4^{2-}$  endogène associée à une augmentation de l'expression des gènes codant les transporteurs impliqués dans les premières étapes de l'absorption et dans la redistribution du  $\text{SO}_4^{2-}$  (Tableau II-3A). Ces augmentations d'expression des gènes codant les transporteurs de  $\text{SO}_4^{2-}$  concernent les groupes 1 à 4 chez *Brassica napus* avec en particulier une forte expression des transporteurs du groupe 1 (*BnSultr1;1* et *1;2*) et 4 (*BnSultr4;1* et *BnSultr4;2*) au niveau racinaire (cf § II.2, Parmar *et al.*, 2007). Les capacités d'absorption racinaire du  $\text{SO}_4^{2-}$ , qui peuvent être multipliées par 7 en conditions de carence en S (Massonneau *et al.*, 1997), résultent d'une augmentation de la densité de transporteurs plasmalemmiques impliqués dans l'acquisition racinaire du sulfate.





**Figure II-16 :** Evolution de la quantité de RuBisCO par unité de surface dans les feuilles de *Brassica juncea* (carrés) et *Brassica campestris* (cercles) cultivés en présence (+S, symboles noirs) ou absence de sulfate (-S, symboles blancs) (d'après Ahmad & Abdin, 2000b). Les barres indiquent les erreurs standards ( $n = 9$ ). En réponse à une privation en sulfate, la quantité de RuBisCO par unité de surface est moins importante qu'en conditions non limitantes en S.

En réponse à une limitation en S, le  $\text{SO}_4^{2-}$  vacuolaire préalablement stocké est remobilisé (Blake-Kalff *et al.*, 1998, Parmar *et al.*, 2007) et l'expression des transporteurs de  $\text{SO}_4^{2-}$  vacuolaires (Kataoka *et al.*, 2004 ; Figure II-7), susceptibles d'être impliqués dans l'efflux chez le colza, (*BnSultr4;1* et *BnSultr4;2*) est augmentée non seulement au sein des racines mais aussi dans les feuilles (Parmar *et al.*, 2007 ; Figure II-15). Par ailleurs, les travaux de Parmar *et al.* (2007) soulignent également que le niveau d'expression des gènes codant les transporteurs de  $\text{SO}_4^{2-}$  dépend du stade de développement de la feuille. L'expression de *BnSultr4;1* est plus rapidement augmentée dans les feuilles matures que celle de *BnSultr4;2* (Figure II-15). Les capacités d'assimilation du sulfate sont également rapidement augmentées (Koralewska *et al.*, 2009) suite à des augmentations de l'expression (Tableau II-3A) et de l'activité de l'APS réductase (APR).

En situation de limitation en S, chez *Arabidopsis thaliana*, la réduction des capacités photosynthétiques associée une perte de fluidité membranaire causée par la diminution de sulfolipides peut conduire à un stress oxydatif (Nikiforova *et al.*, 2005). Parallèlement, des travaux ont mis en évidence une forte augmentation de l'expression d'un gène codant un homologue de l'isoflavonoïde réductase (x 28 ; Nikiforova *et al.*, 2003), enzyme intervenant dans la synthèse des flavonoïdes (Tableau II-3B). De plus, la teneur en S-adénosyl-méthionine (SAM), synthétisée à partir de la méthionine *via* l'intervention de la SAM synthétase, est un composé impliqué dans diverses voies métaboliques (cf. § III.4) qui diminue fortement lors de la carence.

### ***Métabolisme carboné***

Le métabolisme C est également fortement perturbé en cas de carence en S. En premier lieu, la fermeture stomatique observée en réponse à une carence en S, limite l'assimilation de  $\text{CO}_2$  (Gilbert *et al.*, 1997 ; Ahmad & Abdin, 2000b). Cette inhibition de la photosynthèse observée au niveau des jeunes feuilles est accentuée par la baisse de la teneur en chlorophylles (symptôme de chlorose, Figures II-12A et B) et en protéines. En effet, Ahmad & Abdin (2000b) ont montré que la quantité de RuBisCO exprimée par unité de surface était significativement plus faible dans des feuilles de Brassicacées cultivées en l'absence de  $\text{SO}_4^{2-}$  que dans celle des plantes témoins (Figure II-16). Ainsi, la perte du photosystème II (May *et al.*, 1998 ; Giordano *et al.*, 2000 ; Hirai *et al.*, 2003), et la chute des teneurs en protéines soufrées et particulièrement de la RuBisCO, pourrait être la conséquence d'une inhibition de

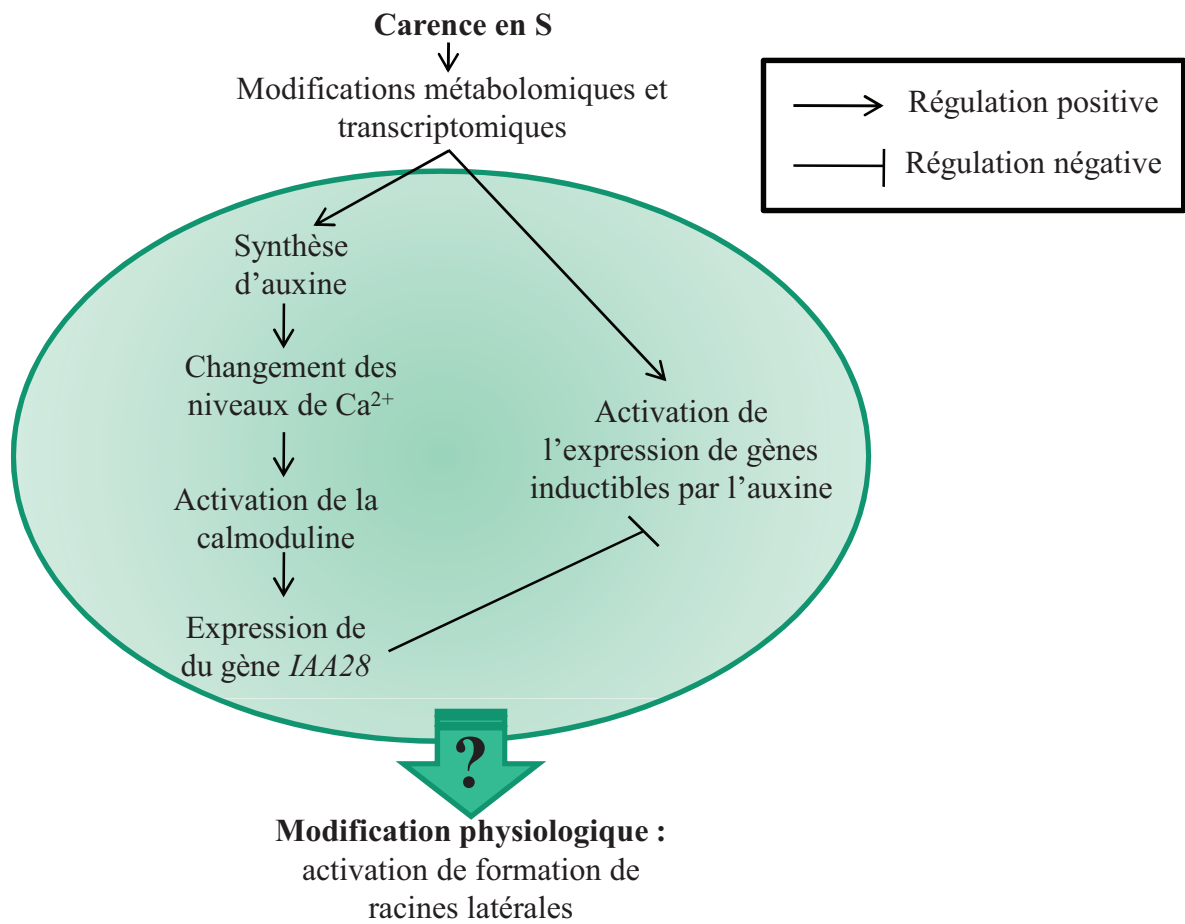
la synthèse *de novo* des protéines essentielles au bon fonctionnement de l'appareil photosynthétique.

De plus, la carence en S induit une réorientation du métabolisme C vers une production d'énergie (*via* l'inhibition de la synthèse de saccharose et d'amidon, l'induction de la glycolyse et de certaines réactions du cycle de Krebs). Selon Nikiforova *et al.* (2005), cette réorientation du métabolisme C permettrait à la plante de survivre et éventuellement de produire des graines. Une accumulation de malate associée à une baisse des teneurs en  $\text{SO}_4^{2-}$  vacuolaire est observée et a même été proposée comme indicateur de carence en S (perte de rendement probable pour un ratio malate/sulfate > 1,5) par Blake-Kalff *et al.* (2002) chez le colza cultivé au champ, en réponse à une fertilisation limitée en sulfate. Toutefois cette accumulation de malate n'est pas une caractéristique retrouvée par les études métaboliques menées plus récemment *in vitro* chez *Arabidopsis* (Nikiforova *et al.*, 2005 et 2006).

### ***Métabolisme azoté***

La réduction des teneurs en composés soufrés observée en cas de carence en S conduit à un déséquilibre du ratio N/S (Karmoker *et al.*, 1991; Zhao *et al.*, 1996; Prosser *et al.*, 1997; Warrilow & Hawkesford, 1998). En effet, des accumulations d'acides aminés et de nitrate sont par exemple observées par Bolton *et al.* (1976) ; Rendig *et al.* (1976) et McGrath & Zhao (1996), soulignant l'importance du S sur le métabolisme N. Les fluctuations de teneurs en S et en N ont d'ailleurs été proposées comme indicateurs possibles de la carence en S (Zhao *et al.*, 1997).

Plusieurs études ont mis en évidence des interactions entre l'assimilation réductrice du sulfate et celle du nitrate (Koprivova *et al.* 2000 ; Prosser *et al.* 2001). Une carence en S provoque une inhibition de l'absorption du  $\text{NO}_3^-$  et une répression de l'activité nitrate réductase (NR), enzyme clé de l'assimilation du de l'azote minéral (Kopriva & Rennenberg 2004). Elle induit également une diminution de la disponibilité en acides aminés soufrés nécessaires à la synthèse des protéines ainsi qu'une accumulation d'autres acides aminés. Les profils métaboliques couplés à des approches transcriptomiques d'une carence en S chez *Arabidopsis* montrent en effet des diminutions de pools d'acides aminés tels que la cystéine, la proline, l'arginine et la méthionine accompagnée d'une accumulation d'autres acides aminés tels que le tryptophane, la sérine, la glutamine, l'asparagine, la glycine, la thréonine, ou encore l'isoleucine (Nikiforova *et al.*, 2006). La cystéine, produit final de l'assimilation



**Figure II-17 :** Représentation schématique des cascades signalétiques impliquées dans les régulations possibles d'expression de gènes sensibles à l'auxine en réponse à une privation de S (adaptée de Nikiforova et al., 2005).

$Ca^{2+}$  : calcium, IAA28 : facteur transcriptionnel impliqué dans la voie signalétique de l'auxine, lui-même inductible par l'auxine.

réductrice du sulfate constitue le carrefour entre les métabolismes S et N. Sa diminution engendre une baisse de synthèse de nombreux métabolites (Figure II-10) impliqués dans la résistance aux attaques pathogènes comme par exemple le glutathion.

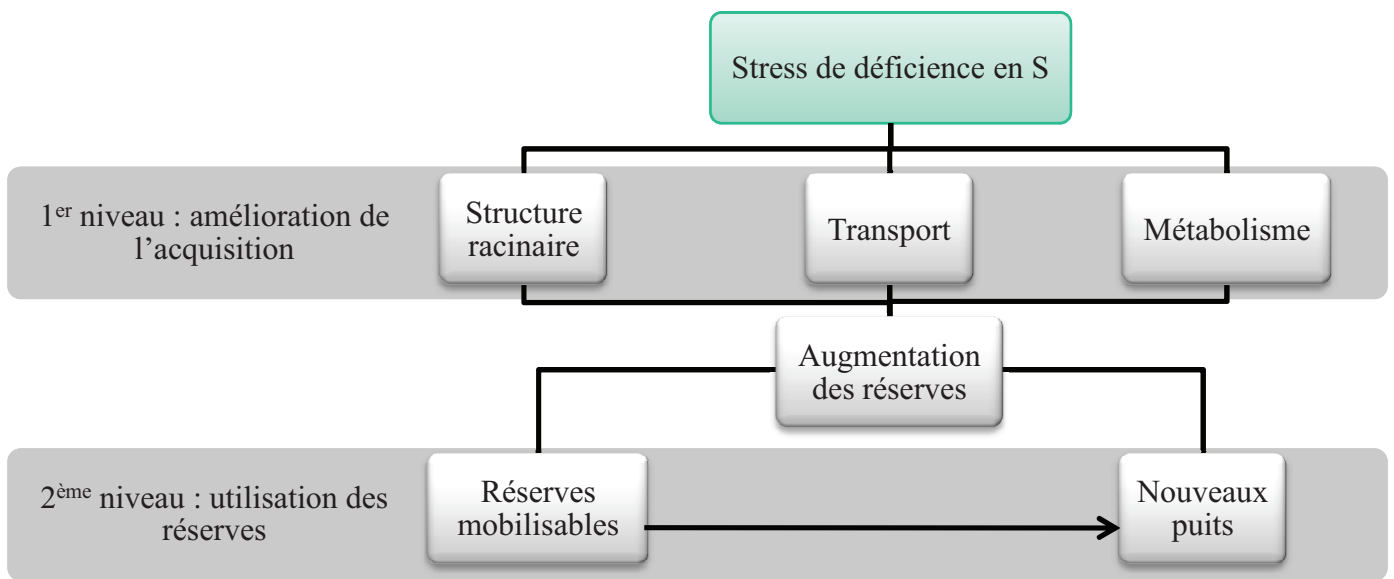
L'O-acétylsérine (OAS), issue de la voie d'assimilation du nitrate est un précurseur nécessaire à la synthèse de la cystéine. L'OAS est particulièrement accumulée en réponse à une carence en S (Kopriva & Rennenberg 2004, Nikiforova *et al.*, 2006). Cette molécule régule positivement l'expression de l'APS réductase et des transporteurs de  $\text{SO}_4^{2-}$ .

### III.4 Perturbations hormonales

En réponse à une carence en S, des modifications hormonales peuvent avoir lieu. Certains gènes impliqués dans la synthèse d'acide jasmonique (comme OPR1, Tableau II-3B) sont induits très rapidement en réponse à une carence en S (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2003. Nikiforova *et al.*, 2003). L'acide jasmonique active l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de GSH ainsi que des gènes codants des enzymes intervenant dans la synthèse d'auxine.

Chez *Arabidopsis thaliana*, une plus forte accumulation du tryptophane et une dégradation de l'indole-3-méthyl-glucosinolate (Glucobrassicine) par la myrosinase et la nitrilase conduit à l'accumulation d'auxine (acide indole-3-acétique) (Tableau II-3B, Figure II-14) (Hoefgen & Nikiforova, 2008 ; Kopriva & Rennenberg, 2004). Tandis que la synthèse d'auxine engendre l'activation de l'expression de certains gènes impliqués notamment dans la prolifération racinaire, la perturbation des teneurs en auxine s'accompagne d'une accumulation de calcium. L'activation de la calmoduline qui s'en suit pourrait alors être à l'origine d'une induction de l'expression de l'*IAA28*, un facteur de transcription qui réprime les gènes inductibles par l'auxine (Figure II-17). Par conséquent, cette boucle de « rétro-contrôle » de l'expression des gènes inductibles par l'auxine ne permet pas de conclure systématiquement à un effet physiologique (activation de formation de racines latérales).

En outre, la SAM, dérivé de la méthionine, donneur de groupement méthyl, est le précurseur de la biosynthèse d'éthylène et de polyamines (Ravanel *et al.*, 1998 ; Giovanelli *et al.*, 1980; Giovanelli, 1990; Hoefgen & Hesse, 2007). Ainsi, une diminution de la SAM peut engendrer une baisse de biosynthèse de ces phytohormones en réponse à une limitation en S (Hesse *et al.*, 2004) et perturber la croissance de la plante.



**Figure II-18 :** Les deux stratégies d'amélioration de l'utilisation du S proposées par Hawkesford (2000).

L'ensemble de ces données démontre que la plante réagit à une limitation en S par des modifications profondes de sa physiologie et de son métabolisme pouvant conduire à une baisse des performances agronomiques. L'interconnexion des différentes voies d'assimilation soufrée, carbonée et azotée rend particulièrement difficile les interprétations concernant les effets physiologiques et métaboliques d'une limitation en sulfate. Cependant les résultats les plus récents permettent d'envisager certaines pistes qui pourraient à terme conduire à améliorer l'EUS.

#### IV. STRATEGIES D'AMELIORATION DE L'EFFICIENCE D'UTILISATION DU S

L'EUS peut être déterminée au stade végétatif par le niveau de production de biomasse aérienne (g biomasse aérienne. mg<sup>-1</sup> S dans les parties aériennes) ou par le taux relatif de croissance (RGR<sup>5</sup>) observé chez les plantes limitées en S en comparaison avec les plantes bien alimentées en S. Au stade reproducteur, l'EUS est estimée à partir des composantes de rendements : production de graines, indice de récolte en S, et teneurs en huile et en protéines des graines (Balint & Rengel, 2009). Les travaux menés par Balint & Rengel en 2009 chez 12 génotypes de colza ont révélé une variabilité génétique de l'EUS soulignant ainsi la possibilité d'une optimisation de cette EUS par amélioration variétale.

Parmi les stratégies d'amélioration de l'EUS envisagées, Hawkesford (2000) a proposé deux pistes principales (Figure II-18) :

- La première stratégie vise à améliorer **l'acquisition du sulfate** faisant intervenir (i) des modifications architecturales des racines, (ii) des régulations transcriptionnelles et (iii) des modifications métaboliques. Maximiser l'acquisition du S mènerait alors à une amplification des réserves soufrées disponibles au sein de la plante.
- Aussi, la deuxième stratégie consiste en une **utilisation efficace des réserves S** par un contrôle (i) de la force puits et (ii) de la mobilisation des réserves au sein des organes sources (elle-même étroitement liée au niveau de disponibilité en N).

---

<sup>5</sup> RGR : Relative Growth Rate

Les différentes stratégies d'amélioration sont abordées dans cette partie en confrontant la bibliographie aux scénaris possibles d'optimisation de l'utilisation du S (par exemple, par sélection variétale).

## **IV.1 Améliorer l'EUS *via* l'optimisation du prélèvement du soufre minéral**

### ***IV.1.1 La modification architecturale des racines***

Chez le colza au stade rosette, une croissance racinaire insuffisante limiterait la surface d'exploration du sol nécessaire à la prospection des ressources disponibles en S et augmenterait les risques de symptômes précoces de carence en S en période hivernale. Une première voie d'amélioration possible d'utilisation du S consisterait alors à contrôler la structure racinaire et sa prolifération (Hawkesford, 2000, Figure II-18).

### ***IV.1.2 Le contrôle de l'expression des transporteurs impliqués dans l'absorption du sulfate***

Des transporteurs à forte affinité pour le sulfate (dans la gamme des micromolaires, Smith *et al.*, 1995, 1997) impliqués dans l'absorption ont été caractérisés chez le colza (cf §2.2, Buchner *et al.*, 2004b). C'est donc vers une optimisation d'expression et non vers une amélioration des activités des transporteurs (déjà optimale pour de faibles concentrations en sulfate) que se tournent les espoirs des généticiens (Hawkesford, 2000 ; Katoaka *et al.*, 2004 ; Saito, 2004).

Des gènes codant des transporteurs de sulfate et des enzymes de l'assimilation du sulfate ont été clonés chez de nombreuses plantes depuis 1992 (Saito *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1995) et, depuis lors, il a été montré que plusieurs de ces gènes impliqués dans l'acquisition du sulfate sont régulés au niveau transcriptionnel en conditions limitantes (Takahashi *et al.*, 1997 ; Hawkesford, 2000; Leustek *et al.*, 2000; Saito, 2000). Ces inductions de l'expression des gènes (Figure II-15 et Tableau II-3) peuvent aboutir à une plus forte expression de la protéine codée et accroître ainsi les capacités d'absorption.

L'expression des transporteurs de sulfate est naturellement contrôlée par le statut nutritionnel de la plante (Parmar *et al.*, 2007) et la plus forte expression des transporteurs est due à des systèmes de « dé-répression » en conditions limitantes. La répression de l'expression des transporteurs de sulfate en conditions optimales est partiellement liée au



niveau de composés soufrés réduits circulants. Ce contrôle représente alors un mécanisme optimisant l'absorption des éléments nutritifs selon les conditions de disponibilité en nutriments (Hesse *et al.*, 2004).

Il semble donc qu'en réponse à un stress nutritionnel soufré, le colza soit capable de surexprimer de nombreux gènes intervenant dans l'absorption du sulfate afin d'augmenter ses capacités de prélèvement. On peut en conclure que le colza est potentiellement capable d'améliorer l'EUS *via* l'optimisation du prélèvement du S minéral.

#### **IV.1.3 Les modifications métaboliques**

L'OAS est un régulateur positif de l'expression des gènes codant les transporteurs de sulfate et les enzymes de l'assimilation végétale (Hawkesford, 2000; Leustek *et al.*, 2000; Saito, 2000). La teneur en OAS au sein des organes végétaux est régie par la nutrition S et N : elle augmente en situation limitante en S et diminue en situation limitante en N (Kim *et al.*, 1999). Des rétrocontrôles peuvent intervenir lorsque les capacités d'absorption et de réduction du S minéral sont trop élevées. L'absorption du sulfate est intrinsèquement liée à la disponibilité de cet anion dans le sol, à la demande en S des organes en croissance et également à la fourniture des squelettes C/N.

Pour répondre à une carence en sulfate, les plantes peuvent recourir à l'acquisition du S atmosphérique (SO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>S, De kok, 2005). Dans le contexte actuel de diminution du S atmosphérique des suites de réglementations visant à réduire les pollutions, il est cependant peu raisonnable d'envisager une amélioration de cette voie d'assimilation subsidiaire. Modifier ou stimuler le métabolisme S pour utiliser efficacement le sulfate en optimisant les processus de mobilisation du S des tissus sources vers les tissus puits constitue alors une autre option. Compte tenu du fait que l'expression des gènes codant les transporteurs de sulfate est très fortement augmentée en cas de limitation en S, cette deuxième option semble constituer le véritable levier pour améliorer l'EUS.

## **IV.2 Améliorer l'EUS via l'optimisation de l'utilisation des réserves soufrées endogènes**

### ***IV.2.1 Le contrôle de la « force puits »***

Dans le deuxième niveau de stratégie suggéré par Hawkesford (2000), il est également envisagé d'augmenter la force puits (donc la demande en S) en faisant exprimer par les tissus puits de plantes transformées, des protéines à forte teneur en S (Figure II-18). Il s'agit d'une stratégie également favorable à l'amélioration de la qualité nutritionnelle des produits récoltés.

Cette possibilité a été envisagée par une équipe de chercheurs australiens (Hagan *et al.*) en 2003 en réalisant la construction d'un riz transgénique pour en augmenter la qualité nutritionnelle. La construction génique visait à faire exprimer au sein des grains de riz un gène qui code une protéine riche en S « SSA » (pour « Sunflower seed albumin »). Les résultats se sont révélés décevants puisque les teneurs en S des grains n'ont pas été augmentées.

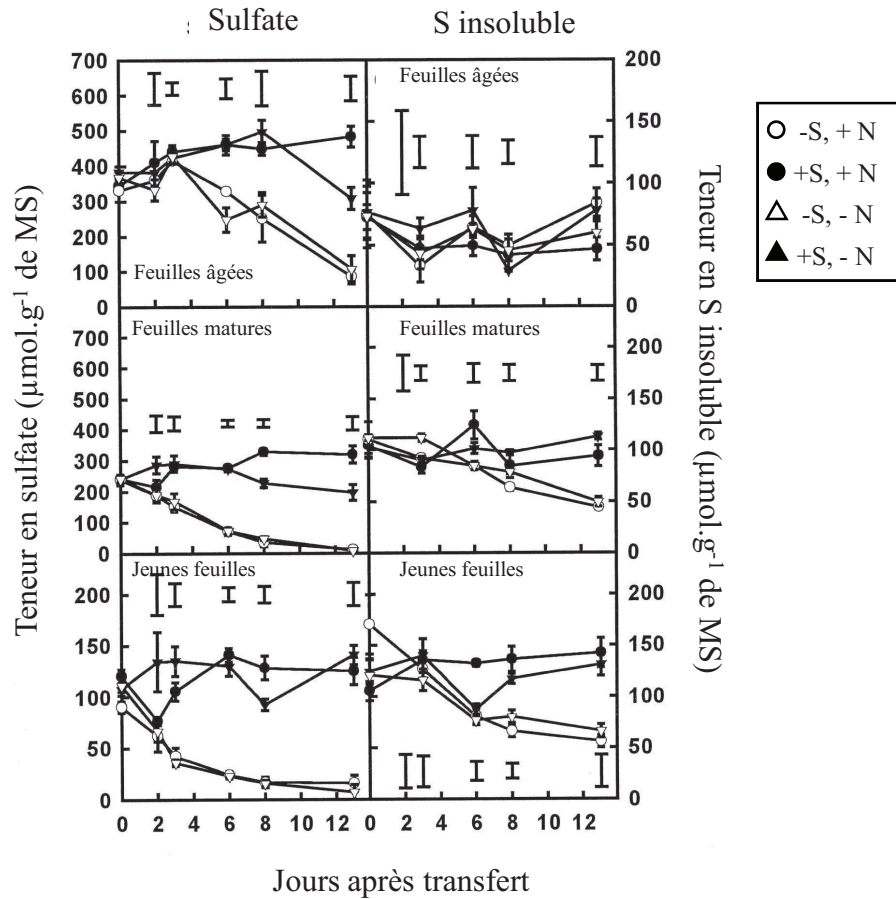
Aussi, la faible EUS du colza au stade reproducteur (Balint & Rengel, 2009) pourrait être améliorée par optimisation d'utilisation des réserves établies aussi bien au stade végétatif qu'au stade reproducteur.

### ***IV.2.2 La mobilisation des réserves soufrées et ses interactions avec l'azote***

Une meilleure compréhension des processus de mobilisation des réserves S au sein de la plante au cours de son cycle de culture apparaît alors comme étant un préalable indispensable à l'optimisation de la gestion du S. La limitation des processus de remobilisation du S, en particulier l'apparente séquestration des réserves S vacuolaires sont à examiner.

La faible efficacité d'utilisation du S engendre un retour au sol conséquent (sur 215 kg  $\text{SO}_3 \cdot \text{ha}^{-1}$  absorbés par la culture de colza, seuls 72 kg  $\text{SO}_3 \cdot \text{ha}^{-1}$  sont exportés vers les graines, source : CETIOM, 2002) qui pourrait s'expliquer par un défaut de vidage en S des feuilles du colza. Une ablation de la moitié des feuilles de colza au stade végétatif provoque une diminution de la biomasse des siliques de 30% (Noquet *et al.*, 2004), confirmant ainsi l'importance de la remobilisation des éléments issus de ces organes.

Actuellement, il est largement évoqué que la valorisation médiocre de l'élément N serait liée à une mauvaise remobilisation du N foliaire au cours du processus de sénescence séquentielle intervenant lors du stade végétatif (Malagoli *et al.*, 2005a). La sénescence marque



**Figure II-19 :** Evolution des teneurs en sulfate et S insoluble (essentiellement protéique) dans les feuilles âgées, matures et jeunes de plantes de colza cultivées en présence de 4 traitements : absence de  $SO_4^{2-}$  et 7 mM de  $NO_3^-$  (-S, +N), 1 mM de  $SO_4^{2-}$  et 7 mM de  $NO_3^-$  (+S, +N), absence de  $SO_4^{2-}$  et 0,25 mM de  $NO_3^-$  (-S, -N) et 1 mM de  $SO_4^{2-}$  et 0,25 mM de  $NO_3^-$  (+S, -N) (d'après Blake-Kalff et al., 1998).

Les plantes ont préalablement été cultivées 3 semaines sur 1 mM de  $SO_4^{2-}$  et 7 mM de  $NO_3^-$  puis transférées sur les différents traitements au jour 0 (J0). Les erreurs standards sont indiquées, n = 3. Les barres verticales représentent la LSD : Least Standard Deviation.

le stade ultime de développement foliaire et se caractérise au niveau macroscopique par un jaunissement de la feuille. Au cours de ce processus, les feuilles s'engagent dans une phase de dégradation massive de leurs macromolécules (lipides, acides nucléiques et protéines). Les éléments issus de ces dégradations sont ensuite redistribués aux organes en croissance, à savoir, en particulier aux jeunes feuilles lors du développement végétatif, ou aux graines au stade de développement reproducteur. Buchanan-Wollaston & Ainsworth (1997) montrent que préalablement à l'hydrolyse des macromolécules, l'expression de nombreux gènes spécifiques de la sénescence est modifiée (*SAGs*: Senescence Associated Genes et *SDGs*: Senescence Down-regulated Genes). C'est le cas du gène *SAG12* (*SAG*) codant une protéase à cystéine, et du gène *Cab* (*SDG*) codant une protéine de liaison aux chlorophylles a/b dont l'expression est respectivement augmentée et diminuée au cours des phases précoces de la sénescence foliaire. Les modulations d'expression de *SAG12* et *Cab*, consécutives à l'entrée en sénescence d'une feuille, constitue un indicateur pertinent pour suivre la progression spatio-temporelle de la sénescence foliaire et estimer l'impact de facteurs environnementaux (exemple carence N) sur la progression de ce processus (Gombert *et al.*, 2006).

Inefficace chez le colza, la remobilisation endogène du sulfate ne suffirait pas à couvrir les besoins en S des jeunes feuilles, organes présentant les premiers symptômes de chlorose (Blake-Kalff *et al.*, 1998). En conséquence, le S protéique des feuilles matures peut être mobilisé afin de compléter les besoin en S des organes en croissance. Cependant, la baisse des teneurs en protéines consécutive à une carence en S est relativement tardive et uniquement observée, de façon surprenante, dans les feuilles matures ou en cours de maturation (Figure II-19). Comparativement aux plantes de colza seulement carencées en S, des limitations en S et N sur une courte période (14 jours) ne semblent pas modifier le taux de mobilisation du S endogène ( $\text{SO}_4^{2-}$  et S-protéique, Figure II-19). Chez d'autres espèces, en revanche, il a été montré que le taux de mobilisation du S pouvait varier en fonction du niveau d'alimentation en N minéral. Par exemple, chez le soja soumis à une carence modérée en N minéral, une réduction des apports en S conduit à une meilleure mobilisation des composés soufrés de réserve (essentiellement des protéines) permettant de satisfaire la demande en S des tissus végétatifs ou des organes reproducteurs en croissance (Sunarpi & Anderson, 1997).

*Bilan :*

Cette synthèse bibliographique montre que l'amplitude des effets de la carence en S sur les performances agronomiques (faible IRS, faible rendement, qualité nutritionnelle des graines altérée) ou sur la physiologie de la plante (notamment les processus de mobilisation du S endogène) dépend de la disponibilité en N du sol et/ou du statut azoté de la plante. En effet, de nombreuses interactions et régulations métaboliques prennent place entre l'assimilation du N et du S au sein de la plante.

Parmi l'ensemble des stratégies d'amélioration possibles de l'EUS chez le colza, la plus pertinente consiste à optimiser les mécanismes de mobilisation du S foliaire.

La sévérité et la précocité d'une limitation en S minéral au cours du cycle de culture du colza est également à prendre en considération dans l'étude des réponses physiologiques de la plante. Aussi, l'étude développée dans le cadre de cette thèse est focalisée au niveau foliaire en tenant compte du stade de développement de l'organe considéré et en développant une approche intégrée de la dynamique du S au sein de la plante.

# Plan de recherche

---

## **Hypothèses et objectifs de recherche**

## **PLAN DE RECHERCHE**

---

---

En vue de déterminer des pistes potentielles d'amélioration de l'efficacité d'utilisation du soufre (EUS) chez le colza d'hiver, **l'objectif général de cette thèse est d'étudier les relations sources-puits vis-à-vis du S en caractérisant plus particulièrement les processus impliqués dans la remobilisation du S foliaire vers les tissus reproducteurs ainsi que les interactions du niveau de disponibilité en N minéral sur ces processus.**

A l'échelle de la feuille, le potentiel de mobilisation du S a été abordé par une étude comparative des processus de mobilisation entre plantes soumises à différents niveaux de disponibilité en sulfate et/ou en nitrate prenant en compte les grandes phases de développement foliaire : feuilles mortes (chapitre IV et VI), sénescence avancée (chapitre IV et V) et en maturation (chapitre V).

A l'échelle de la plante, une approche originale basée sur l'utilisation de traceurs  $^{34}\text{S}$  et  $^{15}\text{N}$  permettant de déterminer les flux S et N endogènes inter-organes a été développée afin d'étudier les conséquences d'une limitation en sulfate appliquée à des stades clés du cycle de développement sur les composantes du rendement et sur le niveau de contribution des composés S et N foliaire à la production de graines (chapitre VI). Déterminer les stades de développement les plus sensibles à une limitation en S et les plus critiques en terme d'efficacité de mobilisation du S foliaire, constitue en effet la principale sortie de cette étude.

Ce projet est organisé autour de trois hypothèses. Comme précisé ci-dessous, chacune des problématiques répond à un objectif de recherche défini sur la base d'une hypothèse et repose sur un dispositif expérimental adapté à la problématique.

### **Etude de l'influence de la fertilisation en N sur la mobilisation soufrée et azotée foliaire (Chapitre IV) :**

**Hypothèse :** La faible EUS du colza pourrait être due à un mauvais vidage des feuilles en S (et plus particulièrement à une séquestration du sulfate) indépendamment du niveau de fertilisation azotée.

**Objectif :** L'objectif est de comparer les dynamiques de S et de N au sein des parties aériennes et de vérifier si le vidage des feuilles est optimal pour des plantes cultivées dans différentes conditions de fertilisations en N.

**Méthodologie :** L'effet de niveaux de fertilisation azotée contrastés sur la mobilisation du S de vieilles feuilles a été analysé. Le S foliaire résiduel a été quantifié dans les feuilles mortes de plantes de colza (*Brassica napus* L.) cultivées dans différentes conditions au champ et en serre en relation avec les positions nodales. La forte proportion du sulfate dans le S foliaire résiduel a ponctuellement été vérifiée. Une relation allométrique (courbe de dilution) entre la teneur en S et la biomasse des parties aériennes a été testée chez des plantes cultivées au champ à différents niveaux de fertilisation en N (collaboration avec Jean-Michel Allirand de l'UMR AgroParisTech-Environnement et Grandes Cultures, INRA, Grignon).

### **Etude de l'effet d'une limitation en sulfate couplée ou non à une limitation en nitrate appliquées au stade rosette sur la mobilisation du S et N foliaire (Chapitre V) :**

**Hypothèse :** La mobilisation foliaire du S, généralement accrue par une limitation en sulfate exogène, pourrait, indépendamment du stade de développement foliaire, être reliée à une surexpression de transporteurs de sulfate tonoplastiques tandis qu'une double limitation en S et en N pourrait entraîner une mobilisation du S protéique associée à une accélération de la sénescence foliaire.

**Objectif :** L'objectif est alors de rechercher quelle est la contribution de la mobilisation protéique au cours de la sénescence dans les mécanismes de remobilisation du S foliaire. Les effets d'une application de différents niveaux de fertilisation en S et/ou en N sur la mobilisation foliaire du sulfate et sur l'expression de transporteurs de sulfate tonoplastiques font également l'objet de cette étude.

**Méthodologie :** Notre démarche préliminaire a consisté à caractériser la progression spatio-temporelle de la sénescence séquentielle en réponse aux différents stress nutritionnels



appliqués en conditions contrôlées. Afin de vérifier cette hypothèse, l'évolution des profils d'expression des gènes *SAG12* et *Cab* a été utilisée comme indicateur moléculaire de la vitesse de progression de la sénescence foliaire. Pour suivre les processus de mobilisation des composés soufrés en réponse à des limitations en S et/ou N, nous avons utilisé au préalable le traceur isotopique stable  $^{34}\text{S}$  sur une longue période de croissance suivie d'une période de chasse à partir de l'application des limitations en S et/ou en N. Aussi, pour mieux appréhender les mécanismes de mobilisation du sulfate en réponse aux différents traitements, un suivi de l'expression des transporteurs de sulfate vacuolaires identifiés chez *Brassica napus* L. a été effectué.

### **Etude de l'effet d'une limitation en S appliquée à différents stades de développement sur la mobilisation du S et N foliaire et ses conséquences sur les composantes du rendement (Chapitre VI) :**

**Hypothèse** : Les composantes de rendement et la part que représente la remobilisation des composés foliaires dans le remplissage des graines pourraient être modifiées par la période d'occurrence de la limitation en sulfate au cours du cycle de développement.

**Objectif** : L'objectif est de rechercher la période optimale de fertilisation en S en étudiant les composantes de rendements et les relations sources-puits vis-à-vis du S et du N en réponse à des niveaux contrastés de fertilisation en S appliqués aux stades de développement C2 (GS32) (= début de montaison c'est-à-dire début de développement de la tige), D2 (GS53) (= bourgeons floraux visibles) et G1 (GS70) (= début de remplissage des graines) du colza d'hiver.

**Méthodologie** : Les productions de biomasse et composantes de rendement (nombres de graines produites par plante, poids de 1000 graines, nombres de siliques, longueur des siliques, indices de récolte en S et en N, efficacité d'utilisation du S et du N) sont étudiées en réponse aux traitements. L'analyse de la composition des graines (teneurs en huile, protéines et glucosinolates des graines, composition lipidique des graines) a été menée en collaboration avec l'UMR118 INRA-Agrocampus Rennes-Université de Rennes1 (Nathalie Nesi, Véronique Gautier). Pour suivre les processus de remobilisation des composés soufrés et azotés, nous avons utilisé les traceurs isotopiques stables  $^{34}\text{S}$  et  $^{15}\text{N}$  avant une période de chasse associée à des niveaux de fertilisation en S contrastés appliqués en conditions contrôlées à différents stades de développement du colza jusqu'à obtention des graines.

# Chapitre III

---

## **Matériels & Méthodes**

## **CHAPITRE III**

### **MATERIELS & METHODES**

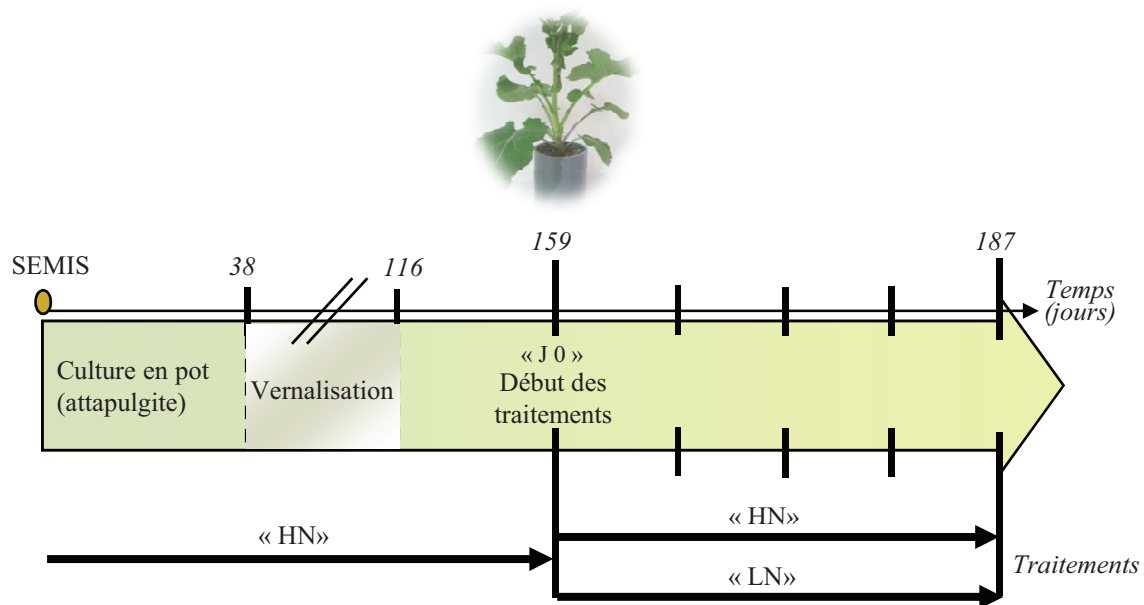
---

#### **I. MATERIEL VEGETAL ET CONDITIONS DE CULTURES**

La variété de colza (*Brassica napus* L.) oléagineux « 00 » utilisée pour les différentes expérimentations est Capitol. Ce colza d'hiver est une lignée pure caractérisée par une reprise de végétation mi-précoce et par une floraison et maturité mi-tardives. Il s'agit d'une variété obtenue par SEMENCES CARGILL proposée à l'inscription au catalogue officiel en 1995. Notre étude se porte sur Capitol en raison des nombreux travaux et données observées en serre ou au champ par l'UMR INRA-UCBN 950 EVA sur cette variété tant au niveau des capacités d'absorption qu'en terme de remobilisation du N (Rossato *et al.*, 2001 ; Noquet *et al.*, 2004 ; Malagoli *et al.*, 2004, 2005a,b ; Gombert, 2006 ; Desclos *et al.*, 2008).

L'étude de l'effet de différents niveaux de disponibilité en N sur la mobilisation en S et N foliaire a reposé sur une ré-exploitation d'échantillons issus d'expérimentations réalisées dans le cadre d'autres travaux de thèses focalisés sur l'EUA du colza, en serre par Desclos (2008) (cf § I.1.1), et au champ par Gombert (2007) (cf § I.1.2). Des échantillons de feuilles issues de ces expérimentations ont été réutilisés pour déterminer les teneurs en S (et en sulfate pour certains d'entre-eux).

Les travaux de recherche présentés dans ce mémoire visant à d'étudier les effets de déficiences en S sur la mobilisation en S et N foliaire ont reposé sur des expérimentations réalisées en conditions contrôlées et spécifiquement développées au cours de cette thèse (cf § 2).



**Figure III-1 :** Représentation schématique du dispositif expérimental mis en place pour l'étude des effets de différents niveaux de fertilisation en nitrate sur la mobilisation en S et N foliaire (cv. Capitol, conditions contrôlées).

L'expérimentation débute à « J0 », c'est-à-dire 159 jours après la date du semis. Quatre semaines après « J0 », 3 plantes sont récoltées parmi les plantes de colza correctement alimentées en N (Témoin HN) et les plantes carencées en N (LN). La concentration en nitrate de LN correspond à 0.4 mM de  $KNO_3$ , soit 10% de HN (HN = 4 mM de  $KNO_3$ ).

## **I.1 Dispositifs expérimentaux mis en place pour l'étude de l'influence de la fertilisation en N sur la mobilisation soufrée et azotée foliaire**

Les dispositifs expérimentaux décrits dans cette partie ont été élaborés dans le cadre de travaux de thèse de Julie Gombert (2006) et Marie Desclos (2008) dont l'objectif premier était d'étudier les effets d'une fertilisation en N sur l'efficacité de mobilisation foliaire en N. Les échantillons foliaires issus de ces expérimentations ont été réutilisés dans cette thèse afin de déterminer le potentiel de mobilisation du S à l'échelle de la feuille, par une approche comparative entre plantes soumises à différents niveaux de disponibilité en nitrate. L'étude a été focalisée au niveau d'un rang foliaire (feuille #8 pour l'expérimentation mise en place en conditions contrôlées, § I.1.1) et sur des feuilles mortes (pour l'expérimentation développée au champ, § I.1.2).

### ***1.1.1 Mise en place de la culture de colza d'hiver en conditions contrôlées (Desclos, 2008)***

Les semences de colza (cv. Capitol) sont stérilisées en surface avec de l'éthanol à 80 % (v/v) pendant 30 secondes puis avec de l'hypochlorite de sodium à 20 % (v/v) pendant 20 minutes. Elles sont ensuite rincées abondamment à l'eau déminéralisée et mises à germer sur un substrat synthétique (mousse de synthèse, Oasis growing pinpot, Agrimedia, TCA Engineering, Battenheim, France). Les plantes sont ensuite repiquées sur attapulgite au moment de l'apparition de la troisième feuille, environ 15 jours après le semis. Les plantes sont arrosées avec une solution nutritive contenant 4 mM KNO<sub>3</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.40 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.15 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 mM Fe-Na EDTA, 14 µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5.0 µM MnSO<sub>4</sub>, 3.0 µM ZnSO<sub>4</sub>, 0.7 µM CuSO<sub>4</sub>, 0.7 µM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 0.1 µM CoCl<sub>2</sub>, appliquée par arrosage automatique (120 mL par plante par jour). Après 38 jours de croissance, les plantes sont soumises à une période de vernalisation de 78 jours : les héméroperiodes étaient de 16 h suivies de nyctipériodes de 8h, et les thermopériodes étaient de 8°C (jour) et 4°C (nuit) en moyenne. Après vernalisation, les plantes sont soumises à des thermopériodes de 20°C (héméroperiodes appliquées de 16 h) et 15°C (nyctipériodes de 8h) en moyenne. Le stade d'élongation de la tige (avec une hauteur de tige d'environ 15 cm) est repéré 43 jours après la sortie de vernalisation, et correspond au jour nommé « J0 » de l'expérimentation (Figure III-1). A partir de J0, deux niveaux de fertilisations en nitrate sont appliqués : 4 mM KNO<sub>3</sub> pour le traitement Fort N (HN : High N) et 0.4 mM KNO<sub>3</sub> pour le traitement Faible N (LN : Low N) pendant 4 semaines. Ces solutions nutritives sont appliquées par arrosage automatique

**Tableau III-1 :** *Composition de la solution nutritive utilisée en hydroponie pour des plantes témoins HS-HN.*

Macroéléments	Concentration (mM)	Microéléments	Concentration ( $\mu$ M)
CaCl <sub>2</sub>	3	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	14
KNO <sub>3</sub>	1	MnSO <sub>4</sub>	5
KCl	2	ZnSO <sub>4</sub>	3
MgSO <sub>4</sub>	0,2913	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4	CuSO <sub>4</sub>	0,7
Fe-Na-EDTA	0,2	CoCl <sub>2</sub>	0,1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,15		

(180 mL par plante par jour). Les feuilles correspondant au rang foliaire #8 ont été récoltées après 4 semaines de traitement. Après congélation à  $-80^{\circ}\text{C}$ , lyophilisation, pesée et broyage en poudre fine, ces échantillons ont été micropesés puis analysés à l'IRMS pour déterminer les teneurs en S (cf §5.1). Une extraction et un dosage de sulfate ont également été effectués sur ces poudres végétales selon la méthode décrite §5.3.

### ***1.1.2 Description du site et dispositif expérimental de culture de colza d'hiver au champ (Gombert, 2006)***

#### *Mise en place de la culture :*

L'expérimentation réalisée sur les parcelles expérimentales de Grignon (INRA-EGC;  $48^{\circ}51'\text{N}$ ;  $1^{\circ}57'\text{E}$ ) a été conduite en 2003-2004. La culture précédente était de l'orge d'hiver. Le semis de colza d'hiver (cv. Capitol) a été réalisé le 27 août 2003 sur un sol limoneux à une densité moyenne de 71 plantes au  $\text{m}^2$  en rangs séparés de 17,5 cm. Des apports de  $100 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  de potassium et de phosphore ont été effectués le 3 septembre 2003. Une fertilisation soufrée (kiésérite) de  $75 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  a été apportée le 24 février 2004.

#### *Applications des niveaux de fertilisation azotée et conditions de récolte :*

Deux niveaux de fertilisation azotée ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) ont été retenus au cours de cette expérimentation :  $\text{N}_0$ , correspondant aux parcelles qui ne reçoivent pas de fertilisation supplémentaire en N et  $\text{N}_{200}$ , correspondant aux parcelles recevant  $200 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$  ( $100 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$  le 15 septembre 2003,  $40 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$  le 24 février et  $62 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$  le 16 mars 2004).

Les plantes sont récoltées toutes les trois semaines à partir de la montaison (4 mars 2003) jusqu'à la fin du cycle de culture (8 juillet 2004). Le choix des plantes a reposé sur 2 critères : la hauteur moyenne des plantes au sein du couvert et le diamètre moyen du pivot (mesuré à la base du collet) (Gombert, 2006). A chaque récolte, les organes de chaque plante ( $n=6$ ) sont séparés en feuilles mortes (ou chutées), feuilles vertes, tige + ramifications, fleurs et siliques. Pour la récolte des feuilles chutées, le pétiole des feuilles sénescentes qui sont encore présentes sur la plante, est préalablement attaché à la tige par un fil en nylon. Grâce à ce dispositif, qui permet la récolte des feuilles sénescentes entre deux dates de récolte, il est possible de déterminer de manière très précise la biomasse des feuilles chutées (feuilles mortes) ainsi que leurs teneurs en N et en S tout au long de l'expérimentation. Les parties aériennes récoltées au  $\text{m}^2$  ont été utilisées pour une étude de dilution du S et du N (Plénet and Lemaire, 2000).

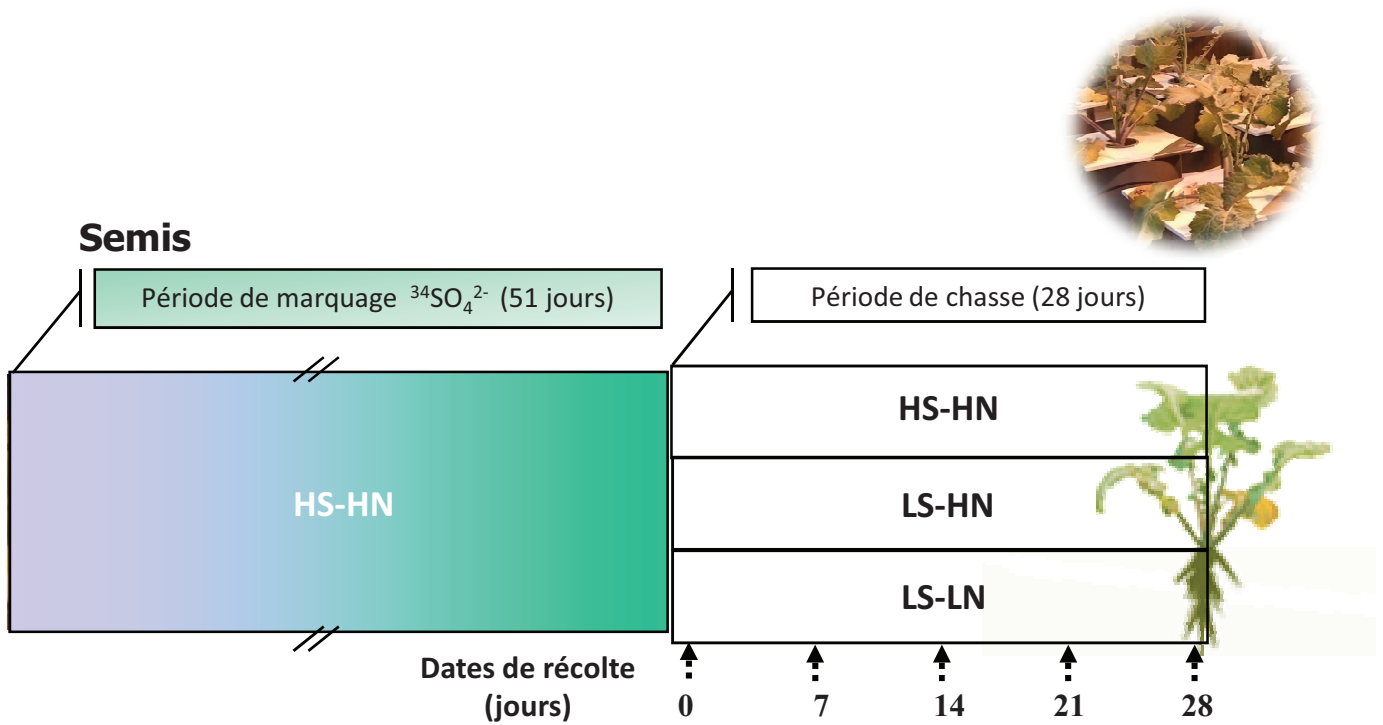
## **I.2 Dispositif expérimental mis en place pour l'étude de l'effet d'une limitation en sulfate couplée ou non à une limitation en nitrate appliquées au stade rosette sur la mobilisation du S et N foliaire**

Le dispositif expérimental décrit dans cette partie a été mis en place afin de déterminer le potentiel de mobilisation du S à l'échelle de la feuille, par une approche comparative entre plantes soumises à une restriction en sulfate couplée ou non à une limitation en nitrate. Dans le cadre de cette expérimentation, l'étude a été réalisée sur les rangs foliaires présentant des états physiologiques différents et plus particulièrement au niveau de feuilles en maturation (rang foliaire #10) et de feuilles sénescence (rang foliaire #8).

Les semences de colza (cv. Capitol) sont stérilisées (selon la méthode décrite §1.1) et mises à germer en présence d'eau ultra pure sur un grillage pour les conditions hydroponiques. Les semis sont ensuite disposés dans des bacs de 20 L contenant une solution nutritive (composition indiquée dans le Tableau III-1) renouvelée une fois par semaine jusqu'à obtention d'une rosette à 10 feuilles environ. La solution nutritive a été complétée 2 fois par semaine en  $\text{KNO}_3$  (1 mM) et en  $\text{MgSO}_4$  (0,3 mM) pour maintenir les concentrations en nitrate et en sulfate respectivement à 1 et 0,3 mM. Les plantes ainsi cultivées en bac sont ensuite individuellement repiquées en pot en conditions hydroponiques. Les plantes sont cultivées en salle climatisée avec des héméropériodes de 16 h suivies de nyctipériodes de 8h, les thermopériodes sont de 20°C (jour) et 15°C (nuit) en moyenne. Elles reçoivent un éclairage artificiel dispensé par des lampes Philips green power (valeur moyenne du PAR, « Photosynthetically Active Radiations », obtenu à 15 cm au-dessus du collet : 400  $\mu\text{moles de photons}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ).

Afin de différencier le S néo-assimilé du S acquis avant le début des traitements et d'en suivre l'évolution au sein de l'organe étudié, un marquage au  $^{34}\text{S}$  (isotope stable du S) a été effectué. Ce type d'expérimentation permet de distinguer la contribution du S absorbé avant le début des traitements dans la dynamique du S endogène observée au cours de l'expérience. Ainsi, les plantes ont été marquées à l'isotope stable  $^{34}\text{S}$  avec un excès isotopique de 1% durant les 51 jours de culture en hydroponie précédant le début des traitements (Figure III-2). Le  $^{34}\text{S}$  étant apporté sous forme de sulfate, il a été nécessaire de produire au préalable du sulfate marqué à partir de soufre élémentaire marqué. Pour cela, le  $^{34}\text{S}$  est préalablement





**Figure III-2 :** Représentation schématique du dispositif expérimental mis en place pour l'étude des effets d'une restriction en sulfate couplée ou non à une limitation en nitrate sur des plantes de colza au stade rosette.

L'expérimentation débute à « J0 », c'est-à-dire 55 jours après la date du semis et après 51 jours de marquage au  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ . A chaque date de récolte, 4 plantes sont récoltées parmi les plantes de colza témoin HS-HN ; LS-HN ou LS-LN. La concentration en sulfate de LS correspond à 5% de HN (HS = 0,3 mM de  $\text{MgSO}_4$ ), LN = 25% de HN (HN = 1 mM de  $\text{KNO}_3$ )

oxydé en sulfate à l'aide d'une méthode d'oxydation à l'acide nitrique développée au laboratoire et décrite par Varin (2009). Cent milligrammes de  $^{34}\text{S}$  sont chauffés à 200 °C en présence de 10 mL d'acide nitrique fumant. Cette opération est renouvelée deux fois, et la solution contenant le  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  est neutralisée en ajoutant du carbonate de potassium avant d'être filtrée. La prise en compte de l'apport de  $\text{NO}_3^-$  qu'implique l'ajout de ce  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  à la solution nutritive est nécessaire : cet apport est déduit de la concentration souhaitée en  $\text{NO}_3^-$  au final. Durant cette période de marquage, les plantes ont été cultivées sur bac de 20 L (14 plantes par bac). Après ces 51 jours de marquage, les plantes ont été individualisées de manière à ce que chaque plante dispose de 4L de solution nutritive par pot. Les solutions nutritives des plantes de cette culture sont renouvelées de manière hebdomadaire et ne contiennent plus de  $^{34}\text{S}$  en excès. Il s'agit de la période de chasse durant laquelle 4 plantes par traitement sont récoltées toutes les semaines pendant 4 semaines (Figure III-2). Les traitements appliqués sont : HS-HN (situation contrôle, 0,3 mM de  $\text{MgSO}_4$ , 1 mM de  $\text{KNO}_3$ ) (composition indiquée Tableau III-1), LS-HN (20 fois moins de sulfate que chez les plantes HS-HN), LS-LN (20 fois moins de sulfate et 4 fois moins de nitrate que chez les plantes HS-HN), tels que présentés Figure III-2. Les récoltes sont effectuées de manière à individualiser chaque organe pour un ciblage ultérieur des études biochimiques sur les rangs foliaires d'intérêt.

### **I.3 Dispositif expérimental mis en place pour l'étude de l'effet d'une limitation en S appliquée à différents stades de développement sur la mobilisation du S et N foliaire et ses conséquences sur les composantes du rendement**

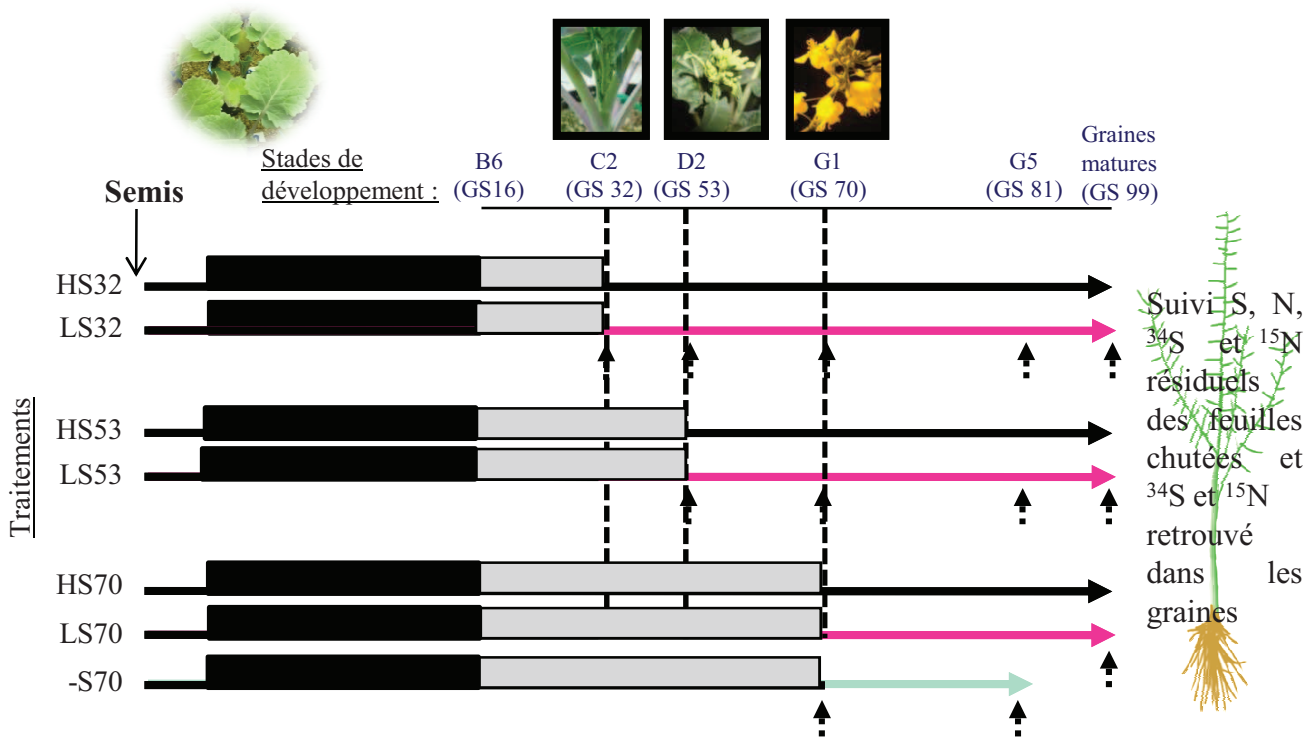
Le dispositif expérimental décrit dans cette partie a été mis en place afin d'aborder l'efficacité de mobilisation foliaire, par une approche comparative entre plantes soumises à une limitation en sulfate appliquée à des stades clés du développement du colza. Cette expérimentation a également permis d'étudier les dynamiques d'utilisation du S à l'échelle de la plante. L'utilisation de traceurs  $^{34}\text{S}$  et  $^{15}\text{N}$  permettant de déterminer les flux S et N endogènes inter-organes a été développée afin d'étudier les conséquences de la période et de la durée de la limitation en sulfate sur les composantes du rendement et sur le niveau de contribution des composés S et N foliaires à la production de graines. Ce dispositif

**Tableau III-2:** Composition de la solution nutritive utilisée (Hoagland 1/4) pour la culture du colza sur perlite-vermiculite

Macroéléments	Concentration (mM)	Microéléments avec S *	Concentration* (µM)	Microéléments sans S**	Concentration** (µM)
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ,4H <sub>2</sub> O	1,25	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	14	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	14
KNO <sub>3</sub>	1,25	MnSO <sub>4</sub>	5	MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25	ZnSO <sub>4</sub>	3	ZnCl <sub>2</sub>	3
MgSO <sub>4</sub>	0,5* ou 0**	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,7	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,7
EDTA,2NaFe,3H <sub>2</sub> O	0,2	CuSO <sub>4</sub>	0,7	CuCl <sub>2</sub>	0,7
MgCl <sub>2</sub>	0,5* ou 0**	CoCl <sub>2</sub>	0,1	CoCl <sub>2</sub>	0,1

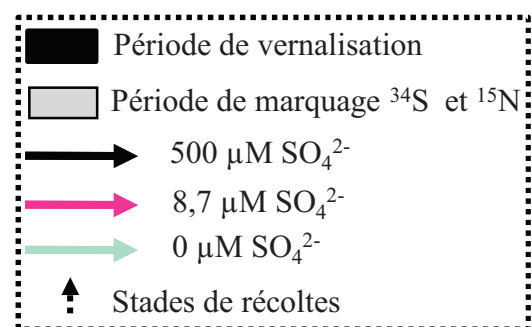
\*Pour la solution à 8,7 µM SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>

\*\*Pour la solution à 0 M SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>



**Figure III-3 :** Représentation schématique du dispositif expérimental mis en place pour l'étude des effets d'une restriction en sulfate appliquée à différents stades ontogénétiques.

Les codes utilisés pour chacun de ces traitements sont indiqués à gauche du schéma et correspondent aux conventions suivantes: HS pour High S (niveau optimal de disponibilité en S), LS pour Low S (limitation en S) et -S (privation en S). Le numéro associé à chaque traitement indique le stade (cf Tableau II.1) correspondant au début de période de chasse et/ou de traitement.



expérimental a également permis de déterminer les stades de développement les plus sensibles à une limitation en S et les plus critiques en terme d'efficacité de mobilisation du S foliaire.

Les semences de colza (cv. Capitot) sont stérilisées (selon la méthode décrite § I.1.1) et mises à germer en présence d'eau ultra pure directement sur vermiculite. La solution nutritive Hoagland  $\frac{1}{4}$  (composition indiquée dans le Tableau III-2) est renouvelée à une fréquence de 2 fois par semaine (20L par bac de 24 plantes). Les plantes sont cultivées en salle climatisée et reçoivent un éclairage artificiel similaire à celui décrit précédemment. Trente six jours après le semis, afin de provoquer la floraison en conditions de culture contrôlées, les plantes ont subi les conditions de vernalisation suivantes : les héméroperiodes appliquées étaient de 10 h suivies de nyctipériodes de 14h, et les thermopériodes étaient de 10°C (jour) et 4°C (nuit) en moyenne. La solution nutritive Hoagland  $\frac{1}{4}$  (composition indiquée dans le Tableau III-2) est toujours renouvelée 2 fois par semaine (20L par bac de 24 plantes).

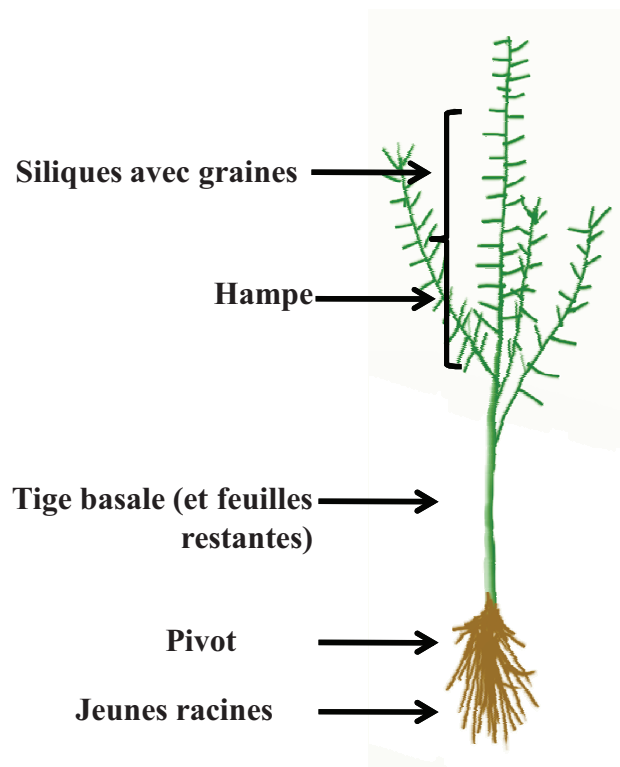
Après une période de vernalisation de 46 jours, les plantes sont repiquées en pot contenant un mélange de vermiculite et de perlite (1/3 vermiculite, 2/3 perlite) et placées en serre dans des conditions d'éclairage et de thermopériode similaires à celles appliquées avant vernalisation. A partir de ce repiquage (sortie de vernalisation), les plantes ont été marquées à l'isotope stable  $^{34}\text{S}$  (excès isotopique de 1%) ainsi qu'au  $^{15}\text{N}$  (excès isotopique de 2%). Cette période de marquage est fonction du stade du développement auquel la limitation en sulfate est appliquée. Ainsi, elle dure respectivement 17, 30, et 44 jours selon que les traitements aient été appliqués aux stades de développement C2 (GS 32), D2 (GS 53) ou G1 (GS 70) (Figure III-3). Afin d'adapter les apports hydriques selon le niveau de développement, les solutions nutritives sont apportées par arrosage automatique de la manière suivante : 90 mL/plante/jour au stade C, 120 mL/plante/jour au stade D, 150 mL mL/plante/jour au stade F, 180 mL/plante/jour au stade G. Les plantes soumises à une limitation en S sont nommées « LS » pour Low S par opposition aux plantes contrôles nommées « HS » pour High S. Les stades à partir desquels le traitement et/ou la période de chasse sont appliqués sont indiqués à la suite de ces dénominations tels que représentés Figure III-3. Les différentes concentrations en sulfate apportées sont :

- 500  $\mu\text{M}$  pour l'ensemble des plantes « HS » tout au long de l'expérience,
- 8,7  $\mu\text{M}$  pour les plantes « LS » à partir des stades C2 (GS 32) pour les « LS32 », D2 (GS 53) pour les « LS53 » ou G1 (GS 70) pour les « LS70 ».



**Figure III-4 :** Photographie présentant la procédure d'annotation des rangs foliaires. Les colliers annotés sont placés autour des pétioles de feuilles matures avant leur chute.

- Séparation racines latérales, pivot, tige basale, tige d'inflorescence, feuilles restantes, et siliques
- Relevé du nombre de siliques par plante et de la longueur maximale de silique
- Pesée de chaque partie (dont les graines)
- Pesée minimum de 100 graines et déduction du nombre total de graines



**Figure III-5 :** Exemple de procédure de récolte suivie au stade de graines matures. Ces mesures ont été réalisées sur 8 répétitions biologiques pour chaque traitement.

Parmi ces 8 répétitions seules 4 d'entre-elles sont aliquotées pour être lyophilisées puis analysées à l'IRMS.

De plus, afin d'estimer la part de S atmosphérique potentiellement assimilable en fin de cycle, un dernier traitement correspondant à une privation totale de sulfate a été appliqué sur un lot de plantes nommées « -S70 » à partir du stade G1 (GS 70). Par comparaison au traitement LS70, ce traitement a également permis d'aborder la différence entre les effets physiologiques d'une limitation en sulfate et ceux d'une privation totale en sulfate.

Les fréquences d'apparitions des feuilles et leur durée de vie sont suivies de manière journalière. Les différents rangs foliaires sont repérés par ordre d'apparition au moyen de colliers annotés (Figure III-4), puis récoltés à leur chute afin de déterminer les teneurs résiduelles en S et N de ces feuilles. Pour exemple, les procédures de récolte de plantes entières au stade G5 sont précisées Figure III-5.

## **II. MESURES DE L'ETAT PHYSIOLOGIQUE DE LA PLANTE**

### **II.1 Mesures de l'activité photosynthétique**

Dans le cadre de la culture décrite en § I.3, l'activité photosynthétique a été mesurée à l'aide de l'analyseur de photosynthèse LI-6400 (LICOR, Lincoln, Nebraska, USA) entre 10 et 14 h. Celle-ci a été menée sur 4 répétitions biologiques par traitement. Cet analyseur est piloté par une interface logicielle pouvant mesurer et enregistrer notamment la photosynthèse sur une surface foliaire de 6 cm<sup>2</sup>. Il est constitué d'une console assurant la gestion des données et le pilotage de l'appareil ainsi que d'une chambre de mesure où sont mesurés les flux gazeux, l'humidité et le niveau d'éclairement au contact de la feuille. Les mesures sont effectuées à l'aide de deux IRGA (Infra Red Gas Analyser) affectés à l'air de référence extérieur pour l'un, et à l'air de l'échantillon pour l'autre. Le rayonnement PAR est fixé à 1000  $\mu\text{moles de photons}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  pour mesurer la capacité photosynthétique apparente en conditions non limitantes.

### **II.2 Détermination de la biomasse et mesure de la surface et de la teneur en chlorophylles des différents rangs foliaires**

Les surfaces foliaires sont mesurées par un planimètre LICOR 300 (LICOR). La teneur relative en chlorophylles des feuilles récoltées est estimée au moyen du système « Soil



**Figure III-6 :** *SPAD (Soil Plant Analysis Development) (Minolta), appareil permettant de mesurer les teneurs relatives en chlorophylles.*

*Deux faisceaux (rouge et infrarouge) sont émis par la pince qui enserre le limbe de la feuille. Les faisceaux traversent la feuille et sont captés par la cellule réceptrice située au niveau de la pince. L'énergie photonique est convertie en signal numérique. Le ratio des intensités de lumière rouge (650 nm, absorbée partiellement par les chlorophylles) et infrarouge (>800 nm, non absorbée) permet de définir une teneur relative en chlorophylles (unité SPAD).*

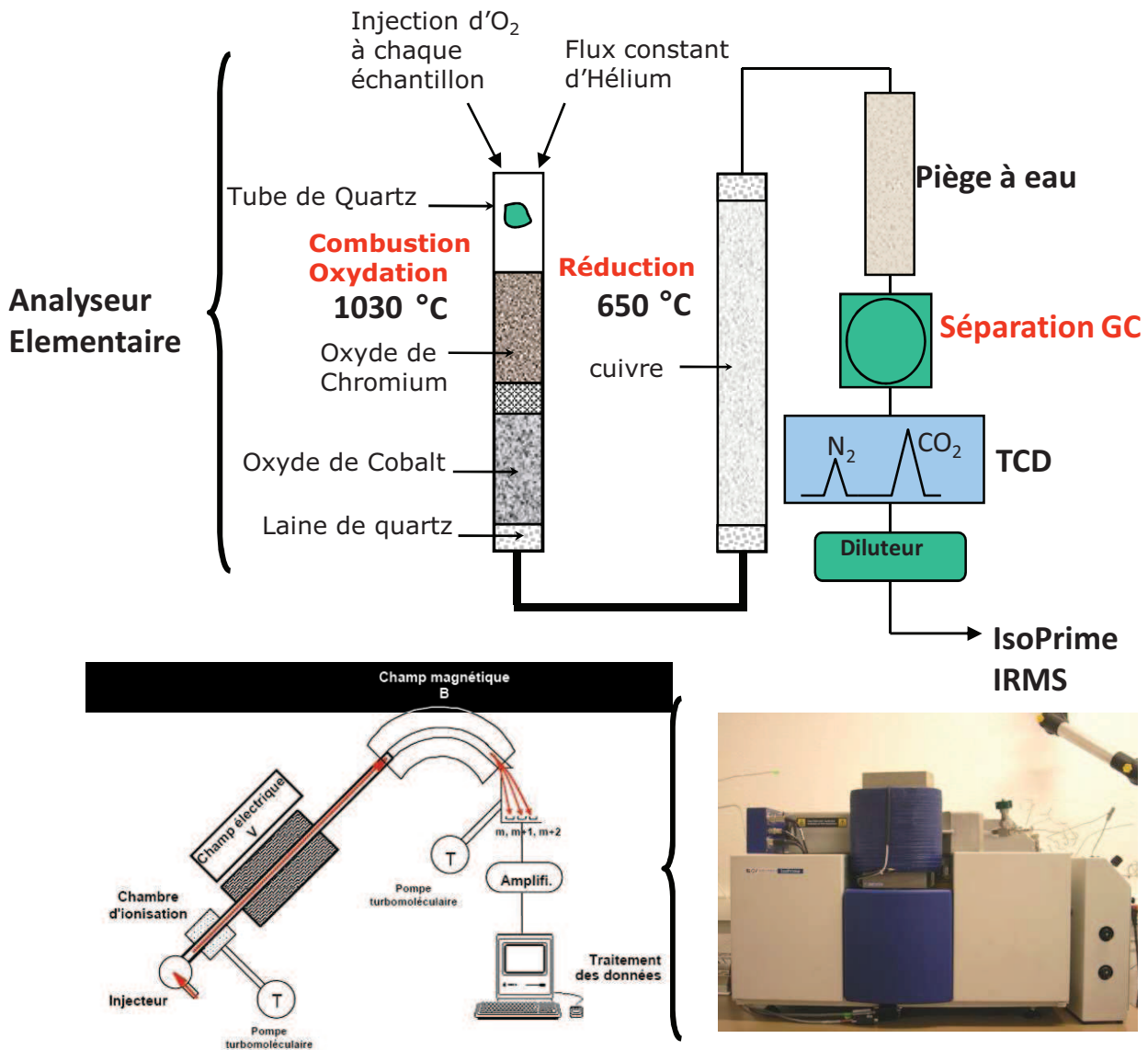
Plant Analysis Development » SPAD modèle 502 (Minolta) (Figure III-6). Deux faisceaux (rouge et infrarouge) sont émis au niveau de la pince qui enserre le limbe, traversent le tissu chlorophyllien, et sont captés par la cellule réceptrice. Celle-ci convertit l'énergie photonique en signal numérique. Le rapport entre les intensités de lumières rouge (650 nm, partiellement absorbée par les chlorophylles) et infrarouge (>800 nm, non absorbée) permet de définir une teneur relative en chlorophylles exprimée en unité arbitraire (ou unité SPAD). Plus la valeur est forte, plus la teneur en chlorophylles est élevée (Monje and Bugbee, 1992).

Les différents organes frais sont pesés pour déterminer la matière fraîche (MF), puis rapidement découpés en petits morceaux afin d'effectuer des aliquotes homogènes, destinés aux différentes analyses biochimiques et moléculaires. Immédiatement après cet échantillonnage, les différents aliquotes sont congelées dans de l'azote liquide, ce qui fige les cellules en l'état. La lyophilisation d'une aliquote de 600 mg (minimum) de MF est ensuite réalisée puis la matière sèche (MS) est déterminée. Les poudres obtenues après broyage sont conservées à -20°C, et peuvent être utilisées ultérieurement pour les différentes analyses N/S et sulfate.

### **II.3 Test de viabilité (vigueur germinative) des semences**

La viabilité des graines produites par les plantes cultivées dans le cadre de la culture décrite en § I.3 a été testée. Les graines ont été mises à germer sur papier filtre Watman imbibé d'eau ultra pure) dans des boîtes de pétri (12x12 cm). Cinquante graines par répétition biologique ( $n=6$  pour HS et  $n= 4$  pour chaque traitement LS) ont été mises à germer pendant 7 jour à 18°C(8h-nuit)-25°C(16h-jour). Le pourcentage de plantules normales en formation a ainsi été représentatif du nombre de graines viables pour chaque traitement.





**Figure III-7 :** Spectromètre de masse de type IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometer de marque Isoprime, GV Instrument, Manchester, Royaume-Uni) couplé à un analyseur élémentaire C/N/S (EA3000, Eurovector, Milan, Italie) utilisé pour déterminer les teneurs en N et S, et le niveau de marquage en  $^{15}\text{N}$  et  $^{34}\text{S}$  dans les différents tissus de colza. La composition des colonnes de l'analyseur élémentaire présentée sur ce schéma correspond à une analyse des teneurs en N.

### III. ANALYSES BIOCHIMIQUES

#### III.1 Détermination des teneurs en S et N totaux et des compositions isotopiques en $^{34}\text{S}$ et $^{15}\text{N}$

Le système utilisé pour la détermination des teneurs en S et N total et les analyses isotopiques comprend un spectromètre de masse (IsoPrime, GV Instruments, Manchester, UK) couplé à un analyseur élémentaire (EA3000, EuroVector, Milan, Italy), assurant la production de  $\text{N}_2$  ou de  $\text{SO}_2$  (Figure III-7). Les échantillons sous forme de poudre sèche finement broyée, sont pesés dans de fines nacelles en étain. La masse précise de l'échantillon est relevée à  $\pm 1 \mu\text{g}$ . Les échantillons sont disposés ensuite dans un injecteur en tête de la colonne d'oxydation de l'analyseur élémentaire en présence d'un flux d'hélium en légère surpression, afin d'éviter toute contamination par l'air. Pour les analyses de N, la combustion totale de l'échantillon a lieu en tête de la colonne d'oxydation (constituée d'oxyde de chromium et de cobalt à  $1030^\circ\text{C}$ ) grâce à une élévation de température ( $1600^\circ\text{C}$ ) assurée par un apport d'oxygène. A la sortie de la colonne d'oxydation, l'échantillon se trouve alors sous forme gazeuse, réduite au cours du passage sur une colonne de cuivre métallique à  $650^\circ\text{C}$  (colonne de réduction). Pour les analyses de S, les échantillons sont injectés dans une colonne qui assure simultanément l'oxydation et la réduction (oxyde de tungstène et cuivre métallique pur à une température de  $1030^\circ\text{C}$ ). C'est après piégeage des molécules d' $\text{H}_2\text{O}$  et de  $\text{CO}_2$  dans des colonnes contenant respectivement du perchlorate de magnésium et du carbosorb® puis passage dans une colonne de chromatographie en phase gazeuse (à  $60^\circ\text{C}$  pour les analyses d'azote et  $95^\circ\text{C}$  pour les analyses de S), que les molécules azotées ou soufrées sont séparées du  $\text{CO}_2$  avant d'être injectées dans le spectromètre de masse isotopique.

Le soufre ou l'azote gazeux est injecté ensuite dans le spectromètre de masse où il est d'abord ionisé. Les ions moléculaires alors formés sont accélérés dans une chambre électrique, puis déviés dans un champ magnétique. Leur angle de déviation est directement affecté par le rapport de leur masse ( $m$ ) à leur charge ( $z$ ). Toutes les molécules ionisées étant de même charge, leur angle de déviation est directement affecté par leur masse. Ainsi, la déviation par exemple du  $\text{N}_2$  de masse 28 ( $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ ) sera plus grande que celle du  $\text{N}_2$  de masse 29 ( $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ ), elle-même plus grande que celle du  $\text{N}_2$  de masse 30 ( $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$ ).

Les ions sont ensuite collectés sur 3 détecteurs. Les signaux qui en résultent sont amplifiés puis transmis à un système informatique. La quantification du N ou du S total est

réalisée en effectuant la somme des signaux ainsi obtenus. Pour chaque échantillon, les données de  $\delta^{15}\text{N}$  et de  $\delta^{34}\text{S}$  prenant en compte les différents signaux comparés à des gaz de référence ( $\text{N}_2$  ou  $\text{SO}_2$ ) injectés entre les échantillons (GV Instrument), sont collectées

L'abondance isotopique est alors calculée selon la formule suivante :

$$A = 100 \times R_{\text{sample}} / (R_{\text{sample}} + 1)$$

Dans le cas du S,  $R_{\text{sample}}$  (ratio isotopique de l'échantillon) est déterminé d'après la formule suivante :

$$R_{\text{sample}} = (\delta^{34}\text{S} \times 0,04415206 / 1000) + 0,04415206$$

La valeur 0,04415206 est celle du Vienna Canyon Diablo Troilite (V-CDT) qui correspond au standard isotopique internationalement reconnu pour les analyses de S.

Pour déterminer les quantités de  $^{34}\text{S}$  en excès, l'abondance naturelle de 4.2549% d'échantillons végétaux de référence (colza non marqué) a été soustraite à la valeur  $A$  avant multiplication par la MS de l'organe étudié.

Concernant le  $^{15}\text{N}$ , le standard isotopique retenu est celui observé au niveau du  $\text{N}_2$  de l'air (abondance naturelle). Ainsi,

$$R_{\text{sample}} = (\delta^{15}\text{N} \times R_{\text{air N}_2} / 1000) + R_{\text{air N}_2}$$

Pour déterminer les quantités de  $^{15}\text{N}$  en excès, l'abondance naturelle de 0,37307% d'échantillons végétaux de référence (colza non marqué) a été soustraite à la valeur  $A$  avant multiplication par la MS de l'organe étudié.

### III.2 Méthodes de calculs de flux de S et de N remobilisés

Les calculs de flux ont été réalisés sur l'expérimentation décrite en § 1.3 suivant la méthode décrite par Avice (1996). Les quantités de  $^{34}\text{S}$  et de  $^{15}\text{N}$  présentes dans les différents organes, pour une date déterminée, sont calculées à l'aide des excès isotopiques calculés selon la méthode décrite précédemment (cf. § III.1). Une normalisation des quantités de  $^{34}\text{S}$  et de  $^{15}\text{N}$

absorbées est effectuée à l'aide de la moyenne des quantités de chacun de ces isotopes, relevées à l'échelle de la plante entière pour chaque date de récolte.

Les longues périodes de marquages permettent une répartition uniforme des isotopes  $^{34}\text{S}$  et  $^{15}\text{N}$  au sein des différents organes et des différentes fractions biochimiques contenant du S et/ou du N. Les calculs de flux de S et de N étant similaire, la méthode de calculs pour l'un de ces deux traceurs présenté ci-dessous (le S) peut être transposée à l'autre (le N).

Nous pouvons distinguer deux types d'organes :

- Les organes « sources », caractérisés par une perte de quantité du traceur étudié sur une durée  $\Delta t$ . Ainsi, entre  $t_0$  (date de début de chasse) et  $t_0+\Delta t$ , la quantité de S remobilisée (QSRs) correspond à :

$$QSRs = QSt_0 \times (Q^{34}St_0 - Q^{34}St_{t_0+\Delta t}) / Q^{34}St_0$$

Où  $Q^{34}St_0$  = quantité de  $^{34}\text{S}$  présent dans l'organe source à  $t_0$ ,

$Q^{34}St_{t_0+\Delta t}$  = quantité de  $^{34}\text{S}$  présent dans l'organe source à  $t_0+\Delta t$ ,

$QSt_0$  = quantité de S total présent dans l'organe source à  $t_0$

$\Delta t$  = période de chasse correspondant à la durée de traitement.

Cette équation, appliquée pour chaque intervalle de temps, permet d'accéder à une cinétique de remobilisation à partir des organes « sources ».

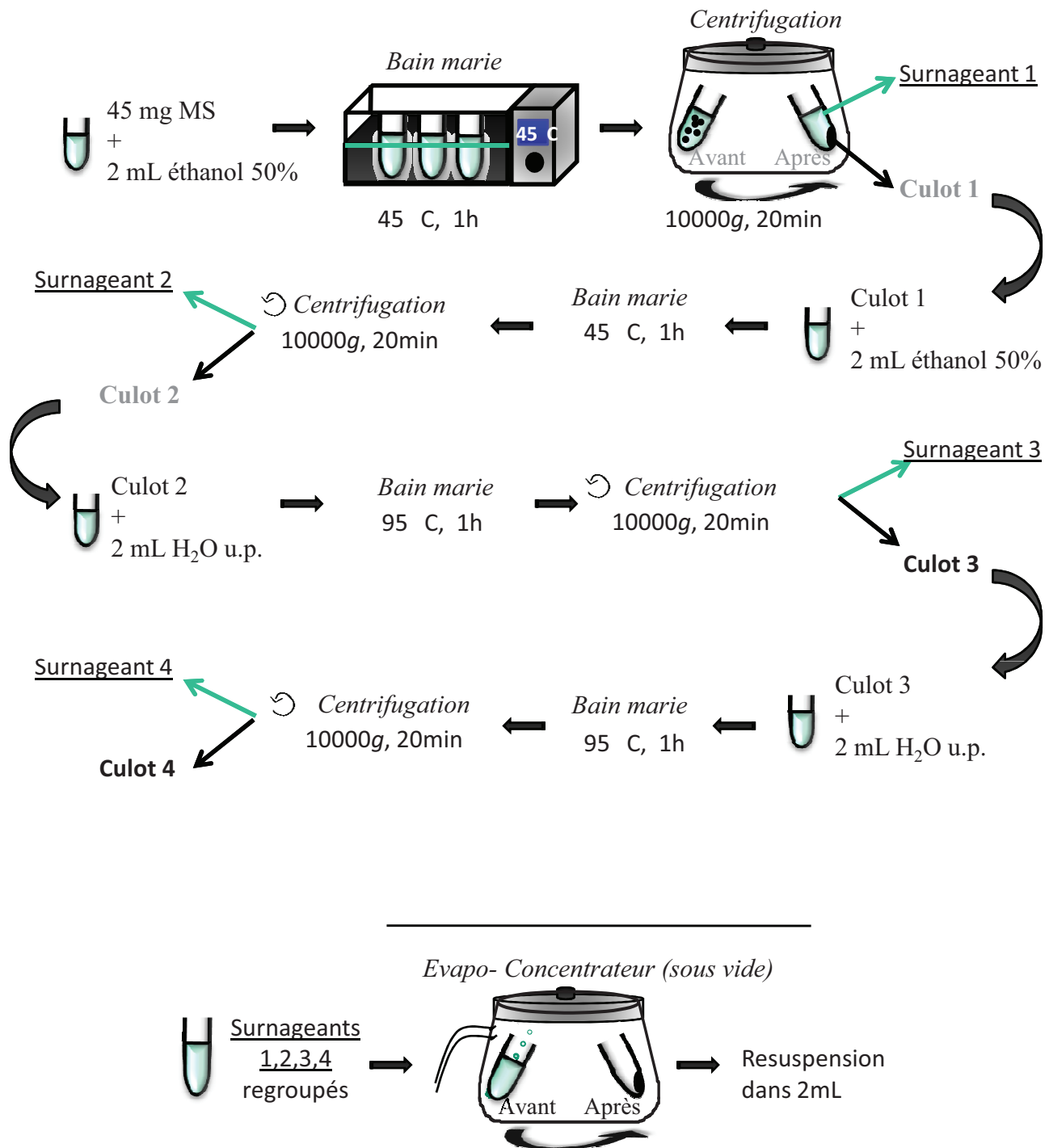
- Les organes « puits », caractérisés par un gain de quantité du traceur étudié sur une durée  $\Delta t$ . Ainsi, entre  $t_0$  (date de début de chasse) et  $t_0+\Delta t$ , la quantité de S issue de la remobilisation (QSRp) correspond à :

$$QSRp = Q^{34}St_{t_0+\Delta t} \times \frac{\sum_{t_0}^{t_0+\Delta t} QSRs}{\sum_{t_0}^{t_0+\Delta t} Q^{34}St_{t_0+\Delta t}}$$

Où  $Q^{34}St_{t_0+\Delta t}$  = quantité de  $^{34}\text{S}$  présent dans l'organe puits à  $t_0+\Delta t$ ,

$\sum_{t_0}^{t_0+\Delta t} QSRs$  = somme des quantités de S remobilisées dans les organes source entre  $t_0$  et  $t_0+\Delta t$ ,

$\sum_{t_0}^{t_0+\Delta t} Q^{34}St_{t_0+\Delta t}$  = somme des quantités de  $^{34}\text{S}$  accumulées dans les organes puits entre  $t_0$  et  $t_0+\Delta t$ .



**Figure III-8 :** Représentation schématique du protocole d'extraction du sulfate à partir de matériel lyophilisé de limbe foliaire (45 mg).

Les calculs de flux permettent le suivi des transferts de S et de N endogènes (provenant des réserves de la plante) et exogènes (issus de l'absorption minérale) au sein des plantes. Ainsi nous pouvons comparer les processus de mobilisation d'un point de vu quantitatif entre les plantes témoins et les plantes soumises à des traitements de limitation en S.

### III.3 Extraction et dosage du sulfate

L'extraction du sulfate nécessite 45 mg de MS de feuilles de colza lyophilisées (Figure III-8). Solubilisé tout d'abord dans 2 mL d'éthanol 50 %, l'extrait est incubé pendant 1h à 45°C avant centrifugation (20 min, 10000 g). Tandis que le surnageant est récupéré, le culot n°1 est soumis à nouveau à une incubation d'1h à 45°C avec 2 mL d'éthanol 50%. Après centrifugation (20 min, 10000 g), le surnageant est récupéré et ajouté au précédent, et le culot n°2 est suspendu dans 2 mL d'eau ultra pure incubé 1h à 95°C, puis centrifugé (20 min, 10000g). Cette dernière étape est réitérée sur le culot n°3 ainsi obtenu. L'ensemble des surnageants est regroupé dans un même tube pour être concentré par évaporation sous-vide (concentrateur évaporateur RC10.22, Jouan, Saint-Herblain, France). Le résidu sec est alors resuspendu dans 2 mL d'eau ultra pure.

La concentration en sulfate est déterminée par chromatographie ionique à haute performance (HPLC, DX100, Dionex Corp, Sunnyvale, CA, USA). Un millilitre d'extrait est injecté grâce à un passeur automatique. Les échantillons sont élués grâce à une solution constituée de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,8 mM) et de Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> (1,7 mM) délivrée par un système de pompe isocratique. Les anions de l'échantillon sont détectés, après séparation, grâce à un détecteur conductimétrique. Le sulfate est quantifié grâce à une calibration du système avec des solutions standard contenant 5 à 50 mg.L<sup>-1</sup> de sulfate.

### III.4 Extraction et dosage des protéines solubles

Pour chaque échantillon, 200 mg de MF de feuilles de colza sont broyés dans de l'azote liquide puis solubilisés dans 500 µL de tampon Mc Ilvaine (citrate 100 mM, sodium phosphate 200 mM, pH 6,8). Après centrifugation (1h, 12000g, 4°C), le surnageant est récupéré et le volume d'extrait protéique est amené à 500 µL. Une aliquote de l'extrait est utilisée pour déterminer la concentration en protéines par microdosage colorimétrique adapté de Bradford

(1976) au lecteur microplaque (MRX Dynex Technologies, Dynex, Guyancourt, France). A 10  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont ajoutés 200  $\mu\text{L}$  de réactif Bradford dilué quatre fois (Bio-Rad Protein Assay). L'absorbance est lue à 570 nm et la quantité de protéines est déterminée par référence à une droite d'étalonnage établie à partir de sérum d'albumine bovine (BSA, Sigma-Aldrich).

### III.5 Méthodes d'analyses de la composition des graines

#### III.5.1 Analyse des lipides

##### *Extraction des lipides et dérivatisation des acides gras*

Les lipides sont extraits des graines de colza mures et sèches puis les acides gras sont transméthylés en milieu acide et sont extraits à l'hexane pour être ensuite analysés et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Des graines de colza mures et sèches sont prélevées et broyées dans un tube Eppendorf contenant 3 billes d'inox à l'aide du broyeur Qiagen (TissueLyser system). Pour chaque échantillon, trois aliquots de 10 mg sont pesés et transférés dans des tubes en verre fermés hermétiquement à l'aide de bouchons à capsules de type Teflon contenant 1,32 mL de solution d'extraction fraîchement préparée (méthanol/acide sulfurique/toluène, 100:2.5:30, v/v/v) et 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'acide heptadécanoïque (C17:0) qui est absent chez les plantes et sert d'étalon interne pour la quantification. Les tubes sont fermés et agités vigoureusement 30 s avant d'être incubés à 95°C pendant 1 h 30. Les acides gras, libres ou estérifiés sous forme de lipides, sont ainsi transformés en esters méthyliques. La réaction est arrêtée par incubation pendant 10-15 min sur la glace. Les esters, après ajout de 1 mL d'eau et de 500  $\mu\text{L}$  d'hexane suivi d'une agitation vigoureuse et d'une centrifugation (850 x g, 5 min, 4°C), sont extraits dans la phase organique.

##### *Chromatographie en phase gazeuse*

Pour chaque échantillon, 1  $\mu\text{L}$  d'extrait est analysé, après dérivatisation, par CPG sur une colonne DB-WAX de 30 m x 0.25 mm x 25  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies). La détection et la quantification des esters méthyliques sont réalisées par ionisation de flamme (Browse *et al.*, 1986). Les conditions utilisées pour les analyses en CPG sont les suivantes : températures fixées à 220°C pour la colonne, 250°C pour l'injecteur et 260°C pour le détecteur. Le gaz vecteur est l'hydrogène à la pression de 100kPa avec un débit de fuite de 100 mL/min. Le chromatographe utilisé est l'appareil GC 6890N (Agilent Technologies) équipé d'un injecteur

automatique et d'un passeur de 100 échantillons. Le pilotage et le traitement des données issues des analyses brutes sont réalisés à l'aide du logiciel GC Chemstation (Agilent Technologies). Le temps d'analyse est de 15 min par échantillon.

Pour déterminer la masse de chaque acide gras l'aire du pic correspondant observé sur le chromatogramme est comparée à l'aire observée pour le pic correspondant au C17:0 dont la quantité présente dans l'extrait est connue précisément. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  d'acide gras par mg de graines.

### ***III.5.2 Détermination des teneurs en huile et en glucosinolates par spectrométrie en proche infrarouge (NIRS)***

Les échantillons sont analysés à l'aide du spectromètre proche infrarouge monochromator NIRSystem model 6500 (FOSS NIRSystem Inc, Silver Spring, MD) équipé d'un module de transport, et en mode réflectance. Environ 5 g de graines matures sèches et intactes sont placés dans une coupelle standard et scannés. Les résultats sont prédits selon une courbe de calibration externe établie pour la teneur en huile et glucosinolates dans les graines de colza (équation commercialisée par CRAW, Gembloux, Belgique). Trois déterminations sont réalisées pour chaque échantillon. Les résultats sont exprimés en % d'huile par g de matière sèche de graines et en  $\mu\text{mol}$  de glucosinolates totaux par g de matière sèche de graines.

## **III.6 Méthodes d'analyses transcriptomiques**

### ***III.6.1 Extraction des $ARN_{\text{totaux}}$ et reverse transcription (RT)***

A environ 250 mg de MF (limbe) broyés à l'azote liquide, sont ajoutés 750  $\mu\text{L}$  de tampon d'extraction (LiCl 100 mM, Tris base 100 mM, EDTA 10 mM, SDS 1 %, pH 8) et 750  $\mu\text{L}$  de phénol (pH 4) ayant été incubés au préalable à 80°C. L'ensemble est mélangé au vortex pendant 4 secondes et 750  $\mu\text{L}$  de chloroforme/alcool isoamylique (24/1, v/v) sont ajoutés. Après homogénéisation (40 secondes de vortex), le mélange est centrifugé (12000 g, 5 min, 4°C). Le surnageant est prélevé et précipité pendant une nuit à 4°C en présence de 750  $\mu\text{L}$  de LiCl 4 M. Après 20 minutes de centrifugation à 12 000 g, le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 250  $\mu\text{L}$  d'eau stérile. Une étape de purification des acides nucléiques en solution aqueuse est ensuite réalisée en ajoutant 250  $\mu\text{L}$  de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1, v/v/v). A l'issue d'une centrifugation (5 min à 12 000 g), la phase



**Tableau III-3 :** Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour les PCR semi-quantitatives. T, Thymine ; A, Adénine ; G, Guanine ; C, Cytosine. La lettre M désigne une Adénine ou une Cytosine. Les numéros d'accèsion (NCBI) des gènes *EF1- $\alpha$*  et *Cab* sont respectivement DQ312264, DQ355993. Les amorces SAG12 sont communes aux gènes SAG12-1 (AF089848) et SAG12-2 (AF089849). La taille de l'amplimère est précisée pour chaque gène.

Gènes	Séquences des amorces	Taille de l'amplimère (en paire de bases)
<i>EF1-<math>\alpha</math></i>	Sens 5'-TTTCGAGGGTGACAACATGA-3'	164
	Anti-Sens 5'-CCGTTCCAATACCACCAATC-3'	
<i>SAG12</i>	Sens 5'-GGCAGTGGCACACCAMCCGGTTAG-3'	267
	Anti-Sens 5'-AGAAGCMTTCATGGCAAGACCAC-3'	
<i>Cab</i>	Sens 5'-GGCAGCCCATGGTACGGATC-3'	161
	Anti-Sens 5'-TCGCTGAAGATCTGT-3'	

phénolique est éliminée et les ARN totaux sont précipités avec 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M, pH 5,2 et 2 volumes d'éthanol absolu, pendant 1 h à -80°C. Après centrifugation (12 000 g, 5 min, 4°C) le surnageant est éliminé et le culot d'ARN totaux est repris dans 100 µL d'eau stérile. Les ARN sont ensuite purifiés (dessalage et traitement DNase) à l'aide du Kit RNeasy Mini Kit selon les recommandations du fabricant (Qiagen, Courtaboeuf). La quantité d'ARN<sub>total</sub> est déterminée par spectrophotométrie (BioPhotometer, Eppendorf) à 260 nm (une unité d'absorbance à 260 nm = 40 µg.mL<sup>-1</sup> d'ARN). La contamination protéique de chaque échantillon est évaluée par la mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm. Un rapport absorbance<sub>260</sub>/absorbance<sub>280</sub> proche de 2 correspond à une faible contamination.

La qualité des ARN<sub>total</sub> extraits est ensuite vérifiée sur gel. A un microgramme d'ARN contenu dans un volume de 5 µL ajusté avec de l'eau stérile sont ajoutés 5 µL de tampon de charge (pour 1 mL : 0,025% de bleu de bromophénol (w/v), 0,025 % de xylène cyanole (w/v), 3 % de glycérol (v/v), 2,5 µL de bromure d'éthidium (BET à 10 mg/mL), 100 µL de MOPS 10X, 615 µL de formamide désionisé et 188 µL de formaldéhyde). Après dénaturation 9 min à 70°C, les ARN totaux sont séparés sur gel d'agarose 1,2% et visualisés sous U.V. Le reste des ADNc est conservé à -20°C avant utilisation pour les réactions de transcription reverse (RT).

La synthèse des ADNc simple brin par RT est réalisée à l'aide du kit « IScript cDNA synthesis » (Bio-Rad). A 1µg d'ARN complété avec de l'eau stérile à 7,5 µL, sont ajoutés 2 µL de Mix IScript 5X (contenant des amorces oligo(dT<sub>15</sub>)) et 0,5 µL d'enzyme Reverse transcriptase. Le mélange est incubé pendant 5 min à 25 °C puis 30 min à 42 °C et enfin 5 min à 85 °C pour stopper la réaction enzymatique.

### **III.6.2 Analyse de l'expression des gènes**

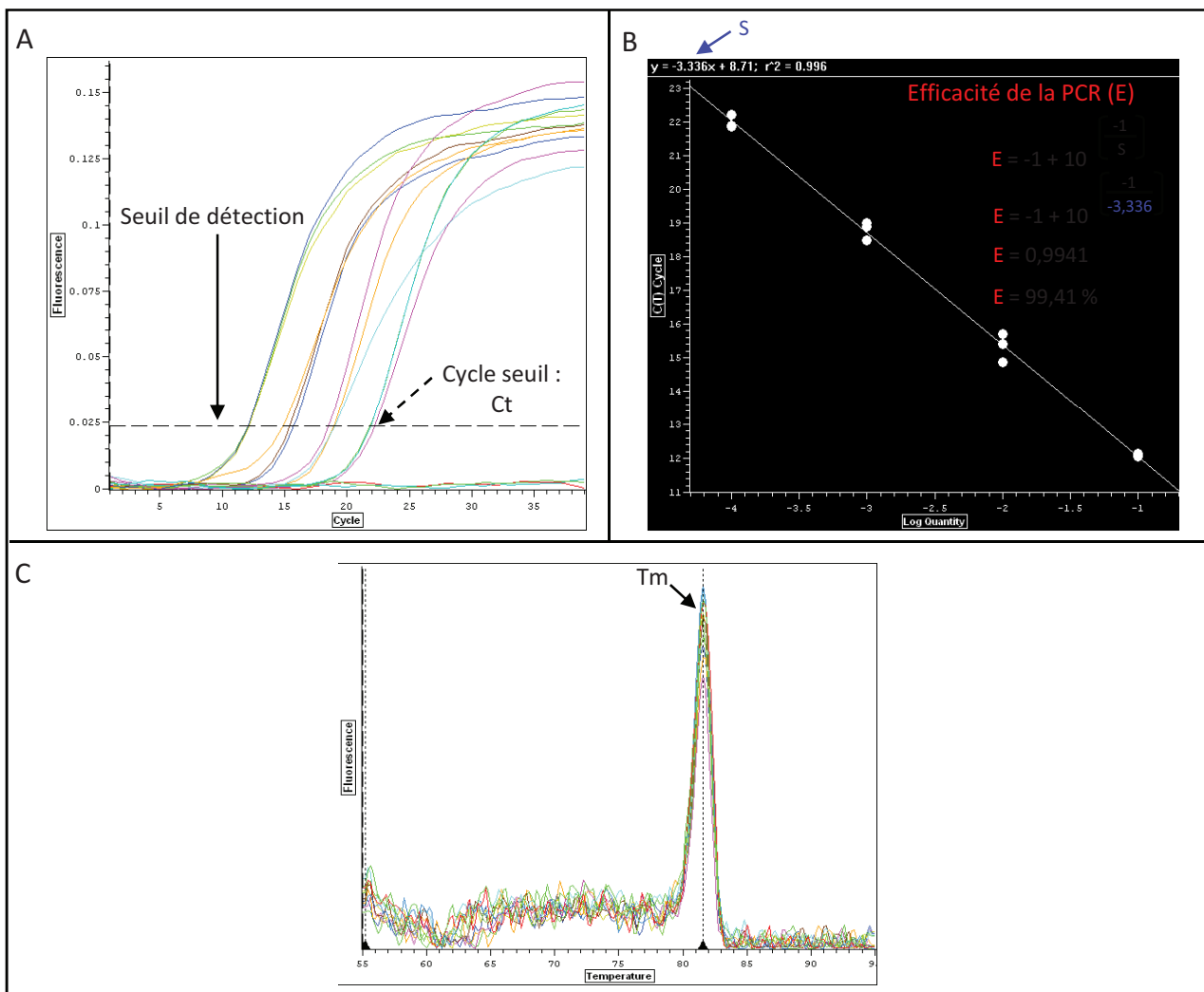
#### **➤ Par PCR semi-quantitative**

Pour chaque gène étudié, le couple d'amorces « sens » et « anti-sens » a été déterminé à partir des séquences nucléotidiques de la banque de données GenBank disponible sur le site du National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Chaque amorce a été définie en utilisant le logiciel Primer 3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi.bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi.bin/primer3/primer3_www.cgi)) selon les critères suivants : une

**Tableau III-4 :** Conditions d'amplification (PCR semi-quantitative) en fonction du gène à étudier. A la fin de la PCR, les produits d'amplification sont analysés sur gel d'agarose 1%.

Etapes	Gène <i>EF1-α</i>	Gène <i>SAG12</i>	<i>Cab</i>
Dénaturation ADN <sup>1</sup>	95°C, 5 min	95°C, 5 min	95°C, 5 min
Dénaturation ADN	95°C, 30 sec	95°C, 30 sec	95°C, 30 sec
Hybridation des amorces	58°C, 30 sec	58°C, 30 sec	58°C, 30 sec
Polymérisation	72°C, 1 min	72°C, 1 min	72°C, 1 min
Terminaison de la polymérisation <sup>2</sup>	72°C, 10 min	72°C, 10 min	72°C, 10 min
Nombre de cycles	28	24	20

<sup>1</sup>: Etape réalisée une seule fois en début de PCR. <sup>2</sup>: Etape réalisée une seule fois en fin de PCR.



**Figure III-9 :** Représentations graphiques de la PCR quantitative (Q-PCR) en temps réel. (A) Courbe représentative d'une amplification par PCR quantitative. L'intensité de fluorescence est fonction du nombre de cycles. La ligne horizontale définit le seuil de détection de fluorescence. (B) Droite obtenue par dilutions en série d'un échantillon d'ADNc donné après PCR quantitative en temps réel. La pente de cette courbe (S) permet de calculer l'efficacité (E) de la PCR. (C) Courbe de fusion représentant la dérivée première négative de la fluorescence en fonction de la température ( $-dF/dT$ ). Cette courbe permet de déterminer le  $T_m$  (température de fusion) des produits amplifiés.

longueur d'environ 20 nucléotides avec un pourcentage de Guanines et de Cytosines si possible supérieur à 50%, une température de fusion de 60°C et une longueur d'amplimère comprise entre 100 et 300 paires de bases (pb). Les oligonucléotides ainsi obtenus ont été synthétisés par Operon Biotechnology et sont présentés dans le Tableau III-3.

Les réactions de PCR sont réalisées à partir de 1 µL d'ADNc dans un volume total de 12 µL en présence de tampon de PCR 1× (Tris HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Triton X100 à 1%, BSA 0,2 mg.mL<sup>-1</sup>), 200 µM de dNTPs, 0,2 µM d'amorces sens et antisens et 0,4 M de Taq polymérase (5U/µL ; QBIogen). Après une étape de dénaturation de 5 minutes à 95°C, un nombre spécifique de cycles d'amplification (Tableau III-4) est réalisé dans les conditions suivantes : une étape de dénaturation de 30 secondes à 94°C, une étape d'hybridation des amorces de 30 secondes à 58°C et une étape d'élongation d'une minute à 72°C. Pour chaque couple d'amorces, le nombre de cycles de PCR est optimisé afin de ne pas être en saturation de signal au moment de la quantification. L'amplimère obtenu est séquencé (Biofidal, Vaulx-en-Velin, France) afin de vérifier la spécificité des amorces utilisées pour la réaction de PCR. Pour l'analyse de l'expression des gènes cibles, les produits d'amplification sont séparés sur gel d'agarose (1%), puis photographiés et quantifiés par le logiciel Biocapt (Vilber Lourmat). Le gène *EF1-α* est utilisé comme gène de référence (Nicot *et al.*, 2005) pour les quantifications des gènes d'intérêt.

#### ➤ *Par PCR quantitative*

La PCR quantitative permet de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant et non en fin de la PCR, comme c'est le cas en PCR semi-quantitative. Le principe repose sur l'incorporation d'un fluorochrome, le SYBR Green, dans l'ADN double brin. Après l'élongation de chaque cycle de PCR, une mesure de fluorescence émise par le SYBR Green incorporé dans l'ADN est réalisée. L'augmentation de la fluorescence est corrélée à la quantité d'ADN synthétisée. La Figure III-9 illustre une courbe expérimentale typique obtenue par Q-PCR. Le signal de fluorescence est au départ en dessous de la limite de détection (bruit de fond) et augmente avec le nombre de cycles pour atteindre une valeur de fluorescence plus élevée que le bruit de fond ; cette valeur de fluorescence est appelée « seuil de détection ». Pour un gène considéré et un échantillon donné, le point d'intersection entre le seuil de détection et la courbe d'amplification permet d'obtenir une valeur de Ct (Cycle

**Tableau III-5 :** Couples d'amorces validés pour l'amplification de transporteurs de sulfate au sein des feuilles et/ou des racines de colza.

Les numéros d'accèsion (NCBI) des gènes sont AJ416460 (BnSultr1;1), AJ311388 (BnSultr1;2), AJ416461 (BnSultr4;1), FJ688133 (BnSultr4;2).

Gènes de transporteurs de sulfate	Couples d'amorces	Tm
<i>BnSultr1;1</i>	Sens 5'- AGATATTGCGATCGGACCAG -3' Anti-sens 5'- GAAAACGCCAGCAAAGAAAG -3'	86°C
<i>BnSultr1;2</i>	Sens 5'- GGTGTAGTCGCTGGAATGGT -3' Anti-sens 5'- AACGGAGTGAGGAAGAGCAA -3'	83°C
<i>BnSultr4;1</i>	Sens 5'- GACCAGACCCGTTAAGGTCA -3' Anti-sens 5'- TTGGAATCCATGTGAAGCAA -3'	85°C
<i>BnSultr4;2</i>	Sens 5'- AGCAAGATCAGGGATTGTGG -3' Anti-sens 5'- TGCAACATTTGTGGGTGTCT -3'	82°C

threshold ou Cycle seuil) qui indique le nombre de cycles nécessaires pour atteindre la valeur seuil de fluorescence (Figure III-9).

#### Détermination et validation des amorces utilisées en Q-PCR :

Les couples d'amorces « sens » et « antisens » des gènes codant des transporteurs de sulfate ont été déterminés et validés au laboratoire au cours de cette thèse (Tableau III-5). Chaque amorce est définie en utilisant le logiciel Primer 3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) selon les critères suivants : une longueur d'environ 20 nucléotides avec un pourcentage de Guanines et de Cytosines si possible supérieur à 50%, une température de fusion de 60°C et une longueur d'amplimère comprise entre 100 et 300 paires de bases (pb). Les oligonucléotides ainsi obtenus ont été synthétisés par Opéron Biotechnology. Le gène *EF1-α* (Nicot *et al.*, 2005) utilisé pour contrôler les étapes de RT et de PCR, sert également de gène de référence au moment de la quantification .

La validation de chaque couple d'amorces nécessite la détermination d'une courbe standard représentant une corrélation linéaire entre le logarithme du facteur de dilution d'ADNc (allant de 1 à 1000 du produit de RT) et le nombre de cycles. Le calcul de la pente de cette droite (S) permet la détermination de l'efficacité de la PCR (E) par la relation suivante :

$$E = -1 + 10^{-1/S}$$

La validation d'un couple d'amorce n'est alors définitive qu'en cas d'efficacité proche de 100%, obtenue pour une valeur de S proche de -3,323 et après vérification par séquençage de l'amplimère (Biofidal, Vaulx en Velin, France).

Pour chaque couple d'amorce, la réaction de Q-PCR est réalisée à partir de 4 µL d'ADNc dilué 100 fois, 500 nM d'amorces et 1× SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad) dans le Chromo4 System (Bio-Rad). La Taq polymérase utilisée est de type Hot Start polymérase, c'est-à-dire une polymérase associée à un anticorps qui rend l'enzyme inactive. Par conséquent, la PCR commence par une étape de chauffage de 3 minutes à 95°C qui a pour but de rompre la liaison entre l'enzyme et l'anticorps et ainsi de permettre à la Taq polymérase d'être active. Un programme de 35 cycles comprenant les étapes suivantes est réalisé : une étape de dénaturation de 15 secondes à 95°C et une étape

d'hybridation/élongation d'une minute à 60°C. A chaque fin de cycle, une lecture de la fluorescence est effectuée. A l'issue des 35 cycles, un protocole de dissociation thermique (de 65°C à 95°C avec un incrément de 0,2°C.s<sup>-1</sup>) des produits d'amplification est réalisé dans le but d'établir la courbe de fusion des produits de PCR générés (Figure III-9) et de s'assurer de la spécificité de l'amplification. Graphiquement, cette courbe de fusion est obtenue en suivant la dérivée négative de la fluorescence (F) en fonction de la température T (-dF/dT). Si la PCR est spécifique, l'ADN double brin correspond à un amplimère unique et majoritaire qui se dissociera (à 50%) à une température donnée appelée T<sub>m</sub>. Cette fusion de l'ADN va entraîner une libération de SYBR Green dans le milieu qui se traduira par une chute de fluorescence matérialisée par l'apparition d'un pic unique au niveau de la courbe de fusion (Figure III-9). Le cas échéant les amorces sont validées. Au contraire si l'amplification est non spécifique, la courbe de fusion révélera la présence de plusieurs pics correspondant aux T<sub>m</sub> des différents amplimères. Dans ce cas, les amorces ne sont pas validées et un autre couple d'amorces doit être défini.

Après validation des couples d'amorces (valeur seuil déterminée, E proche de 100% et un pic unique sur la courbe de fusion), les réactions de Q-PCR sont réalisées en utilisant le même protocole que celui qui a servi à l'élaboration de la courbe standard. Le niveau d'expression relative des gènes d'intérêt est calculé en utilisant la méthode des « delta-delta de Ct ».

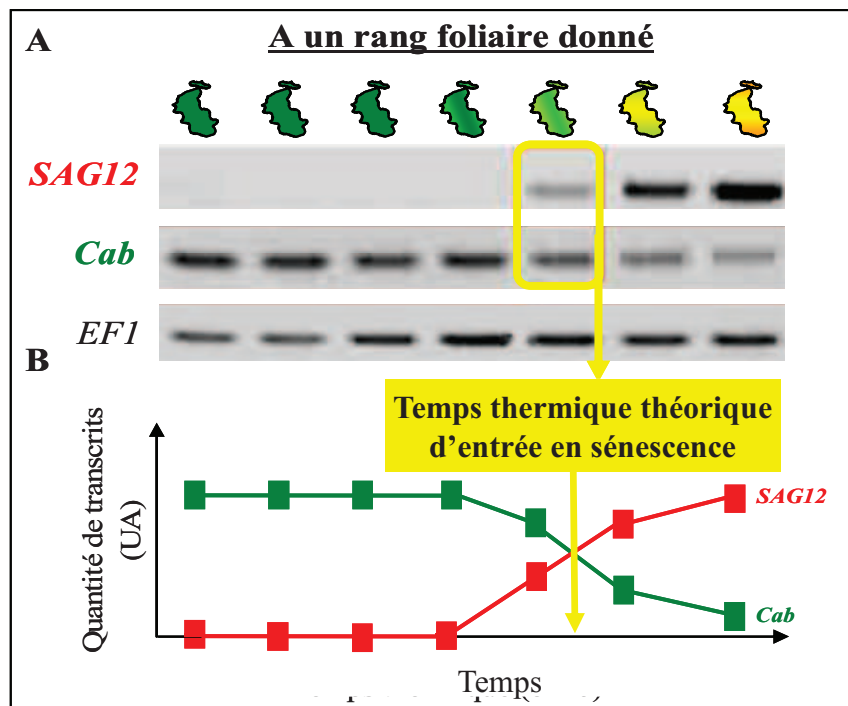
#### Calcul de l'expression relative par la méthode des « delta-delta de Ct » :

La quantification relative des résultats de Q-PCR en temps réel est basée sur la méthode des « delta-delta de Ct » ( $\Delta\Delta Ct$ ). Elle repose également sur l'utilisation d'un gène de référence *EF1- $\alpha$*  dont l'expression est connue pour ne pas être affectée par le traitement. Pour chaque condition expérimentale, les réactions de Q-PCR sont réalisées en triplicats. Comme nous l'avons vu précédemment, les valeurs de Ct sont déterminées graphiquement à partir des courbes d'amplification (Figure III-9). L'expression relative du gène étudié est déterminée en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Expression relative} = (1+E)^{-[\Delta\Delta Ct]} = 2^{-[\Delta\Delta Ct]}$$

En prenant compte que :

- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ traitement} - \Delta Ct \text{ témoin}$  avec le  $\Delta Ct = Ct_{\text{gène étudié}} - Ct_{EF1-\alpha}$



**Figure III-10 :** (A) Cinétique d'expression des gènes *SAG12* et *Cab* par RT-PCR, au sein d'un rang foliaire de Colza. Le gène *EF1-a* est utilisé comme gène de référence. (B) Evolution cinétique des quantités de transcrits des gènes *SAG12* et *Cab* déterminées par PCR semi-quantitative. La flèche indique une augmentation d'expression du gène *SAG12* concomitante à une répression du gène *Cab* correspondant à la date théorique d'entrée en sénescence (D'après Gombert et al., 2006).



- E est l'efficacité de la PCR qui est voisine de 100%. De manière à simplifier les calculs, E est considéré comme égal à 1, donc

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

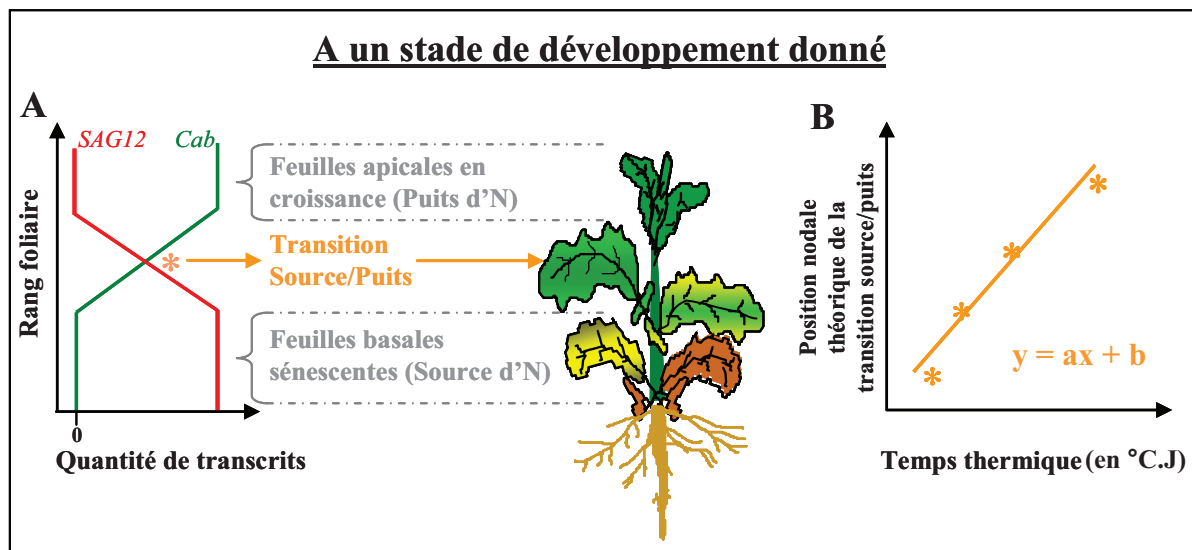
Par définition, l'expression relative du gène cible de l'échantillon Témoin est égal à ( $2^0$ ), c'est-à-dire 1 (Livak et Schmittgen, 2001).

### **III.6.3 Utilisation de l'indicateur moléculaire *SAG12/Cab***

L'expression du gène *SAG12* (codant une protéase à cystéine) et du gène *Cab* (codant une protéine de liaison aux chlorophylles a/b) est utilisée comme indicateur de la sénescence. En effet, Gombert *et al.* (2006) ont montré que cet indicateur permet de déterminer la progression spatio-temporelle de la sénescence foliaire chez le colza en identifiant soit (i) la date théorique d'entrée en sénescence d'un rang foliaire donné, soit (ii) le dernier rang foliaire entré en sénescence à un stade de développement donné. La détermination de la date théorique d'entrée en sénescence d'un rang foliaire est réalisée grâce une analyse cinétique de l'expression du gène *SAG12* (augmentant au cours du processus de sénescence) et du gène *Cab* (diminuant au cours de la sénescence) par PCR semi-quantitative. Cet outil moléculaire a été utilisé sur différents rangs foliaires de la manipulation décrite § I.2.

#### **➤ Détermination de la date théorique d'entrée en sénescence**

Les profils d'expression des gènes *SAG12* et *Cab* d'un rang foliaire donné, sont suivis au cours du temps (Figure III-10). L'évolution cinétique des quantités de transcrits de chacun des gènes permet de déterminer un point d'intersection correspondant à une augmentation de l'expression du gène *SAG12* concomitante à une diminution de l'expression du gène *Cab* (Figure III-10). Ce point d'intersection donne alors accès à une date de transition source/puits d'une feuille pouvant être considérée comme la date théorique d'entrée en sénescence de la feuille (Gombert *et al.*, 2006).



**Figure III-11 :** (A) Représentation schématique de l’expression des gènes SAG12 et Cab à un stade de développement donné dans les différents rangs foliaires de la plante. Le statut azoté (puits ou source pour le N) est indiqué en fonction des niveaux d’expression des gènes SAG12 et Cab. L’astérisque indique la position nodale théorique de la transition source/puits (dernier rang foliaire entré en sénescence) déterminée par l’augmentation de l’expression du gène SAG12 concomitante à la répression du gène Cab. (B) Cinétique de progression de la sénescence foliaire le long de l’axe de la plante. Chaque symbole fait référence à la position nodale théorique déterminée à chaque temps de la cinétique. L’équation de la droite obtenue est de type  $y = ax + b$  où  $a$  est la pente de la droite c’est-à-dire la vitesse de progression de la sénescence, et  $b$  est l’ordonnée à l’origine et correspond au nombre de rangs foliaires sénescents en début de cinétique (D’après Gombert et al., 2006).

➤ **Détermination du dernier rang foliaire sénescant et de la vitesse de la progression de la sénescence foliaire**

La progression spatiale de la sénescence est également étudiée selon cette méthode. A un stade de développement donné, l'expression de ces gènes est suivie au niveau de chaque rang foliaire. La représentation graphique des quantités de transcrits des gènes *SAG12* et *Cab* en fonction du rang foliaire, permet de déterminer un point d'intersection correspondant à une augmentation du gène *SAG12* concomitante à une diminution de l'expression du gène *Cab* (Figure III-11). Ce point d'intersection permet de déterminer la position nodale théorique de la transition puits/source ou encore de déterminer le dernier rang foliaire sénescant sur l'axe de la plante. Ainsi, de manière théorique, il est possible de déterminer le dernier rang foliaire entré en sénescence dans le but de connaître les rangs foliaires se comportant comme des puits ou des sources (Figure III-11). Après détermination de ce rang foliaire théorique à chaque date de récolte, il devient possible d'établir une cinétique de progression de la sénescence foliaire en fonction du temps thermique et ainsi d'estimer la vitesse de progression de la sénescence foliaire (Figure III-11). L'équation de la droite obtenue est de type  $y = ax + b$  où :

- $a$  est la pente de la droite c'est-à-dire la vitesse de progression de la sénescence
- $b$  est l'ordonnée à l'origine et correspond au nombre de rangs foliaires sénescants au début de la cinétique.

#### IV. EXPLOITATION STATISTIQUE DES DONNEES

La variabilité des résultats est exprimée par la moyenne des valeurs obtenues pour l'ensemble des répétitions biologiques ( $n=3$  au minimum)  $\pm$  l'erreur standard (SE).

Des répétitions techniques ont été réalisées en complément des répétitions biologiques pour l'ensemble des analyses biochimiques effectuées.

Enfin, pour chaque date de récolte, l'effet des différents traitements étudiés a été soumis à une analyse statistique sur le logiciel *MINITAB 13* pour *Windows* (Minitab Inc, State College, PA, USA). La normalité de la distribution des données est vérifiée par le test de Ryan-Joiner et l'égalité des variances par le test de Bartlett (à 95%). Lorsque la distribution des données suit une loi normale, les effets des différents traitements ont été comparés par une ANOVA (modèle linéaire généralisé). Lorsque la distribution des données ne suit pas une loi normale, ces dernières ont été comparées par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis,

suivi d'une mise en évidence des différences entre traitements par le test de la médiane de Mood.

# Chapitre IV

---

## Résultats

### Article 1 :

**Hypothèse :** La faible EUS du colza pourrait être due à un mauvais vidage des feuilles en S (et plus particulièrement à une séquestration du sulfate) indépendamment du niveau de fertilisation azotée.

**Objectif :** L'objectif est de comparer les dynamiques de S et de N au sein des parties aériennes et de vérifier si le vidage des feuilles est optimal pour des plantes cultivées dans différentes conditions de fertilisations en N.

**Méthodologie :** L'effet de niveaux de fertilisation azotée contrastés sur la mobilisation du S de vieilles feuilles a été analysé. Le S foliaire résiduel a été quantifié dans les feuilles mortes de plantes de colza (*Brassica napus* L.) cultivées dans différentes conditions au champ et en serre en relation avec les positions nodales. La forte proportion du sulfate dans le S foliaire résiduel a ponctuellement été vérifiée. Une relation allométrique (courbe de dilution) entre la teneur en S et la biomasse des parties aériennes a été testée chez des plantes cultivées au champ à différents niveaux de fertilisation en N (collaboration avec Jean-Michel Allirand de l'UMR AgroParisTech-Environnement et Grandes Cultures, INRA, Grignon).

**Résultats :** Quel que soit le niveau de fertilisation en N, les feuilles mortes chutent avec des teneurs encore élevées en S pouvant engendrer un retour au sol de  $22 \pm 0,7$  kg S.ha<sup>-1</sup>. Une relation allométrique semblable à celle du N vis-à-vis de la biomasse des parties aériennes n'a pu être établie. Cette absence de dilution du S renforce l'hypothèse d'une accumulation du S au sein des feuilles qui serait maintenue aux stades tardifs de développement. En conditions d'alimentation non limitante en soufre minéral, et quel que soit le niveau de fertilisation nitrique le soufre serait donc fortement séquestré au niveau foliaire.

## **CHAPITRE IV**

### **Etude de l'influence de la fertilisation en N sur la mobilisation soufrée et azotée foliaire**

---

**Study of residual S in leaves reveals low S remobilization efficiency in oilseed rape without any effect of mineral N availability.**

L. Dubousset<sup>1</sup>, J. Gombert<sup>1</sup>, M. Desclos<sup>1</sup>, J.M. Allirand<sup>2</sup>, P. Etienne<sup>1</sup>, J.C. Avice<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>INRA, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutrition N.C.S., Esplanade de la Paix, F-14032, Caen, France.

<sup>2</sup>INRA, UMR INA-PG Environnement et Grandes Cultures, F-78880 Thiverval-Grignon.

## ABSTRACT

- *Background and Aims* The dynamics of sulphur (S) in old leaves, residual S and sulphate in fallen leaves were studied in oilseed rape (*Brassica napus* L.) in relation to mineral nitrogen (N) availability.
- *Methods* The effect of contrasted levels of N fertilization on mobilization of S in old leaves was investigated in controlled and field conditions. The leaf residual S quantified in dead leaves was compared to leaf residual N with respect to the nodal positions and mineral N availability. The hypothetical S dilution curves were also verified in field trials, in relation to the level of N fertilization.
- *Key Results* In greenhouse or field conditions, S was accumulated in old leaves mainly in sulphate form (up than 59% of total S). This highlights that under sufficient mineral S availability, sulphate was not efficiently remobilized during leaf senescence. The N availability did not significantly affect foliar S mobilization. This led to fallen leaves that may contain 0.6% of N in dry matter while S could exceed 1.2% in dry matter. Under recommended S fertilization, the amount of S lost by falling leaves in field conditions reached  $22 \pm 0.7$  kg S.ha<sup>-1</sup>. In contrast to N, there was no allometric relationship between S concentrations and shoot dry mass.
- *Conclusions* In adequate S fertilization and at any level of N fertilization, the residual of S amount in fallen leaves on soil was high and the main S component was sulphate. The lack of S dilution as a function of increase in shoot dry mass does not allow an accurate diagnosis of S nutrition by determining an S nutrition index (SNI). The data obtained in field and controlled conditions suggest that optimizing sulphate redistribution from leaves would improve S use efficiency and thereby reduce S fertilization.

**Key words:** *Brassica napus* L., Nitrogen (N), Sulfur (S), Sulphate, old leaves, Sulfur use efficiency, Nitrogen availability.

## I. INTRODUCTION

Over the last few decades, industries have reduced atmospheric pollution particularly in Western Europe by replacing high sulphur (S) coal and oil with low S natural gas, renewable energy sources and nuclear energy. These changes in industrial practices caused by regulation of S emission have resulted in a major reduction in S deposition into the soil (McNeill *et al.*, 2005). These reduced S inputs, coupled with cropping system changes that have resulted in high yielding varieties and intensive agriculture, have thus created a first-time need for S fertilization in some soils. Moreover, like many *Brassicaceae*, winter oilseed rape (*Brassica napus*) requires high amounts of S (McGrath and Zhao, 1996) as well as nitrogen (N) (Colnenne *et al.*, 1998; Rathke *et al.*, 2005), compared to cereals. While a supply of about 20 kg S.ha<sup>-1</sup> can satisfy the high S requirement of oilseed rape in the USA (Jackson, 2000), the recommendations of the technical center of oleaginous production in France (CETIOM<sup>1</sup>) is about 30 kg S.ha<sup>-1</sup>. Oilseed rape is very sensitive to S limitation with consequences for grain yield and nutritional quality of seeds (Janzen and Bettany, 1984; Scherer, 2001). Compared with other nutrient deficiencies, symptoms of S deficiency are less specific and more difficult to identify. In plants suffering from severe S deficiency, young leaves develop chlorosis beginning from the outer parts of the leaf (Schnug *et al.*, 2004). A range of physiological alterations also occurs in plants under sulfate deficiency, including an enhanced rate of sulphate uptake and transport (Koralewska *et al.*, 2009; Parmar *et al.*, 2007).

Oilseed rape exports about 45-50% of its N (Schjoerring *et al.*, 1995), whereas it exports only 10-30% of its S, which is taken up into the grains, and this indicates that a large amount of S taken up by the crop is retained in the vegetative tissues and pod walls (McGrath and Zhao, 1996; CETIOM, 2002). Leaves of *Brassica napus* represent a major organ for storage of nutrients, which may be remobilized for growing tissues, and play a crucial role for recycling compounds to sustain seed filling during the reproductive stage (Noquet *et al.*, 2004). Under field conditions, the leaves of oilseed rape can fall before flowering with high concentrations of N that can exceed 2% of dry weight (Rossato *et al.*, 2001; Malagoli *et al.*, 2005a). This indicates a low ability of the leaves to mobilize N towards the pods produced at the reproductive period and leads to weak N use efficiency. Recent research reported differential S efficiency at the vegetative and grain maturity stages in canola genotypes

---

<sup>1</sup> [www.cetiom.fr](http://www.cetiom.fr)



(Balint and Rengel, 2009), indicating that genotypic variability exists for S use efficiency. Among the processes that could be involved in optimization of S use efficiency in oilseed rape, the enhancement of S remobilization in leaves is highly considered. In oilseed rape subject to S limitation, the major sources of S would be sulphate (70% to 90% of the total S in the middle and oldest leaves accumulated as sulphate) and protein reserves (Blake-Kalff *et al.*, 1998). Considering the occurrence of symptoms of S deficiency in young leaves, whilst older leaves remain green, the hypothesis of a relative immobility of S in mature leaves was suggested (Monaghan *et al.*, 1999; Schnug *et al.*, 2004). Indeed, the redistribution of sulphate stored in the vacuole to sustain S requirements during growth has been reported as a slow process in mature leaves of oilseed rape, except in the case of S limitation (Blake-Kalff *et al.*, 1998; Hawkesford, 2000).

To prevent plant S deficiencies, it would be worthwhile to have an accurate diagnosis of plant S status by determining an S nutrition index (SNI) similar to the commonly used N nutrition index (NNI). The allometric relationship between N concentrations in shoots and aerial biomass is already well documented in wheat (Justes *et al.*, 1994) and in oilseed rape (Colnenne *et al.*, 1998). The N nutrition status is evaluated by the N nutrition index (NNI, defined as the division between the N concentration measured and the critical N concentration associated with the amount of shoot dry matter produced) (Greenwood *et al.*, 1991; Lemaire and Gastal, 1997). A survey conducted by Vong *et al.* in 2007 on spring oilseed rape and barley in a pot experiment has shown an allometric relationship between S concentrations in shoots and shoot biomass. These recent results suggest the possibility of an agronomic application of SNI not yet determined by critical S dilution curves established in field experiments.

Mineral S and N availabilities closely interact with S and N management by the plant (Kopriva and Rennenberg, 2004, Schnug *et al.*, 1993; Fismes *et al.*, 2000). Higher plants assimilate nitrate and sulphate to incorporate N and S into amino acids and proteins, which implies that N and S requirements are closely interrelated. In soybean, Sunarpi and Anderson (1997) have reported that the mobility of S in mature leaves was enhanced by N limitation. They reported a sharper transition from net import in young leaves and net export in mature leaves of S at low levels of mineral N than in control conditions. Since both N and S are constituents of proteins, and low levels of N promote remobilization of N from proteins, this raises the question whether the export of S from mature leaves is linked to the level of available N.

In order to maintain or improve yield and quality of seeds in oilseed rape crops while benefiting the environment through reductions in S fertilizer inputs, it will be necessary to improve the efficiency of endogenous S distribution at the whole plant level (Walker and Booth, 1994, Hawkesford, 2000, Hawkesford and De Kok, 2006). In contrast to studies focused on N use efficiency, there is no clear data reporting that S use efficiency is mainly related to the capacity of S remobilization from leaves of oilseed rape. Additionally, even if the S use efficiency may depend on mineral N fertilization (Schnug *et al.*, 1993), there are few indications about the effect of mineral N availability on leaf S remobilization in oilseed rape. Blake-Kalff *et al.* (1998) reported a decrease in sulphate concentrations in the middle and oldest leaves of plants submitted to low N fertilization (0.25 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> versus 7 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in control), suggesting a modulation of foliar S mobilization by mineral N availability. Because studies of the impact of mineral N availability on S remobilization remain scarce, the aim of the present study was to investigate the residual S concentrations and amounts in leaves of a winter oilseed rape crop (cv. Capitol) in relation with mineral N availability. This survey was conducted in different conditions of culture to verify if the results obtained in controlled conditions were similar in field trials. In addition, the residual concentrations and amounts of S were compared to those of N and the potential sequestration of sulphate in leaves of oilseed rape was studied by characterizing the proportion of the main soluble fraction of S in the endogenous recycling process. The residual S was studied in relation to leaf rank positions to determine if the foliar S restitution to the environment would be related to the date of emergence. Additionally, an eventual allometric relationship between S concentration and shoot biomass, similar to the N dilution curves in field conditions, was studied in relation to the level of N fertilization.

## II. MATERIALS AND METHODS

Two types of experiments have been used for this study. The first experiments were performed under greenhouse conditions in order to determine the effects of mineral N availability on the level of S mobilisation and residual S in old leaves of oilseed rape. The second experiment was carried-out in field conditions with the aim of validating the data observed under controlled conditions.

## II.1 Greenhouse experimental designs, mineral N treatments and sampling

Seeds of *Brassica napus* L. (cv. Capitot) were sterilised by exposure to 80% ethanol for 30 s followed by treatment with 20% sodium hypochlorite for 20 min. Several washes in demineralised water were carried out and then seeds were germinated on foam growing media (Oasis growing pinpot Agrimedia, TCA Engineering, Battenheim, France). Just after emergence of the third leaf, seedlings were transferred to attapulgite (one plant per pot) for greenhouse experiment 1 (Exp. G1). The nutrient solution of experiment G1 contained 4 mM KNO<sub>3</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.40 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.15 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 mM Fe-Na EDTA, 14 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5.0 μM MnSO<sub>4</sub>, 3.0 μM ZnSO<sub>4</sub>, 0.7 μM CuSO<sub>4</sub>, 0.7 μM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 0.1 μM CoCl<sub>2</sub>, and 120 mL per plant was automatically applied each day. After 38 days of growth, plants were submitted to 8°C (day) and 4°C (night) for 78 days for vernalisation. Forty three days after the vernalisation treatment, at the bolting stage (stem elongation corresponding to day 0 of the experiment), two different levels of mineral N were applied for 4 weeks: High N (HN): 4 mM KNO<sub>3</sub>, Low N (LN): 0.4 mM KNO<sub>3</sub>. During the N treatments, nutrient solution was automatically supplied (180 mL per plant per day). The thermoperiod was 20°C (day) and 15°C (night). During the application of mineral N treatment, the mature leaf rank #8 was harvested at 28 days after the start of the experiment and the relative chlorophyll concentration using a SPAD (Soil Plant Analysis Development) chlorophyll meter (Minolta, SPAD-502 model) was determined. Leaf samples were freeze-dried, weighed for dry matter (DM) determination and ground to a fine powder.

For greenhouse experiment 2 (Exp. G2), seeds were sterilized as described above and germinated on vermiculite. Seedlings were grown for 36 days with a thermoperiod of 20°C (day) and 15°C (night), using a 25% Hoagland nutrient solution consisting of 1.25 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1.25 mM KNO<sub>3</sub>, 0.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 mM Fe-Na EDTA, 14 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5 μM MnSO<sub>4</sub>, 3 μM ZnSO<sub>4</sub>, 0.7 μM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 0.7 μM CuSO<sub>4</sub>, 0.1 CoCl<sub>2</sub>, renewed twice per week. The plants were then submitted to 8°C (day) and 4°C (night) for 46 days for vernalisation with the same nutrient solution renewed twice per week. After this period of vernalisation, each plant was transferred to a pot containing a mix of 1/3 vermiculite and 2/3 perlite (one plant per pot) and submitted to a thermoperiod of 20°C (day) and 15°C (night). Each day, nutrient solution (25% Hoagland) was automatically applied with an increasing volume as a function of the growth stages: 90 mL per plant at the start of the bolting stage, 120 mL per plant at the buds visible stage, 150 mL per plant at the flowering

stage, and 180 mL per plant at the seed maturation stage. Each leaf was accurately identified and numbered according to its date of emergence using a labelled collar suspended on the petiole of each leaf rank after maturity (leaf rank number). Thus, changes of the S concentrations and amounts in fallen leaves were monitored in leaves appeared from the start of bolting stage to mature stages. Leaf samples were freeze-dried, weighed for DM determination and then ground to a fine powder for S and sulphate analyses.

## II.2 Field experiment: experimental site, mineral N treatments and sampling

The field experiment (Exp. F) was conducted at Grignon (France, INRA-EGC Station; 48°51'N; 1°57'E) in the growing season of 2004 (Gombert, 2006). The preceding crop was winter barley. *Brassica napus* L. (cv. Capitol) was sown on a loamy soil on the 27<sup>th</sup> of August, at a density of 71 plants per m<sup>2</sup> and with a row spacing of 17.5 cm. At the sowing date, the soil initially contained 90.3 ± 11 kg of N. Potassium and phosphorus were applied in an amount of 100 kg ha<sup>-1</sup> on the third of September 2003. S was applied in kieserite form in an amount of 75 kg.ha<sup>-1</sup> on the 24<sup>th</sup> of February 2004. Two mineral N treatments were defined: Low Nitrogen (LN) and High Nitrogen (HN) receiving 0 and 200 kg N ha<sup>-1</sup>, respectively. N fertilizer was applied as NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> for the HN treatment as 100 kg N ha<sup>-1</sup> on the 15<sup>th</sup> of September 2003, 40 kg N ha<sup>-1</sup> on the 24<sup>th</sup> of February and 60 kg N ha<sup>-1</sup> on the 16<sup>th</sup> of March. For the analysis of S and N concentration in the different fallen leaves as function of their nodal position, the choice of the harvested plants was made with the help of two mean criteria (Gombert, 2006): the size of plants and the taproot diameter. During the field experiment, the bottom of the petiole of the senescing leaves was attached to the stem by a nylon thread in order to collect the dropped leaves later. Thus, changes of the S and N concentrations and amounts in fallen leaves were monitored from stem extension to maturity. Shoots taken on 1 m<sup>2</sup> were also harvested to determine the allometric relationship between total N (or S) accumulation in shoot and the shoot dry matter as described by Colnenne *et al.* (1998), using the following equation:

$$\%N \text{ (or S)} = \alpha(\text{shoot biomass})^{-\beta},$$

where the coefficient ' $\alpha$ ' represents N (or S) concentration in shoots for a value of DM of 1 t.ha<sup>-1</sup> and ' $\beta$ ' characterizes the pattern of decrease of %N (or S) during growth (Plénet and Lemaire, 2000). Shoots were harvested every third week from the 21<sup>th</sup> of October until final

harvest on the 21<sup>th</sup> of June. Shoot and leaf DM was determined after drying at 80°C for 48 h and ground to a fine powder for S and N quantifications. Leaf sub-samples were also freeze-dried and then ground to a fine powder for sulphate analyses.

### II.3 S and N analyses

Samples were weighed and placed into tin capsules. Both total S and N concentrations in the plant samples were determined with a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (IRMS Isoprime, GV Instruments, Manchester, UK) linked to an elemental analyser (EA3000, EuroVector, Milan, Italy). The N amount of a leaf rank “i” at a given time “t” was calculated with dry mass (Md) as:

$$N_{tot,i,t} = \%N_{i,t} \times Md_{i,t},$$

and the S amount of a tissue “i” at a given time “t” was calculated as:

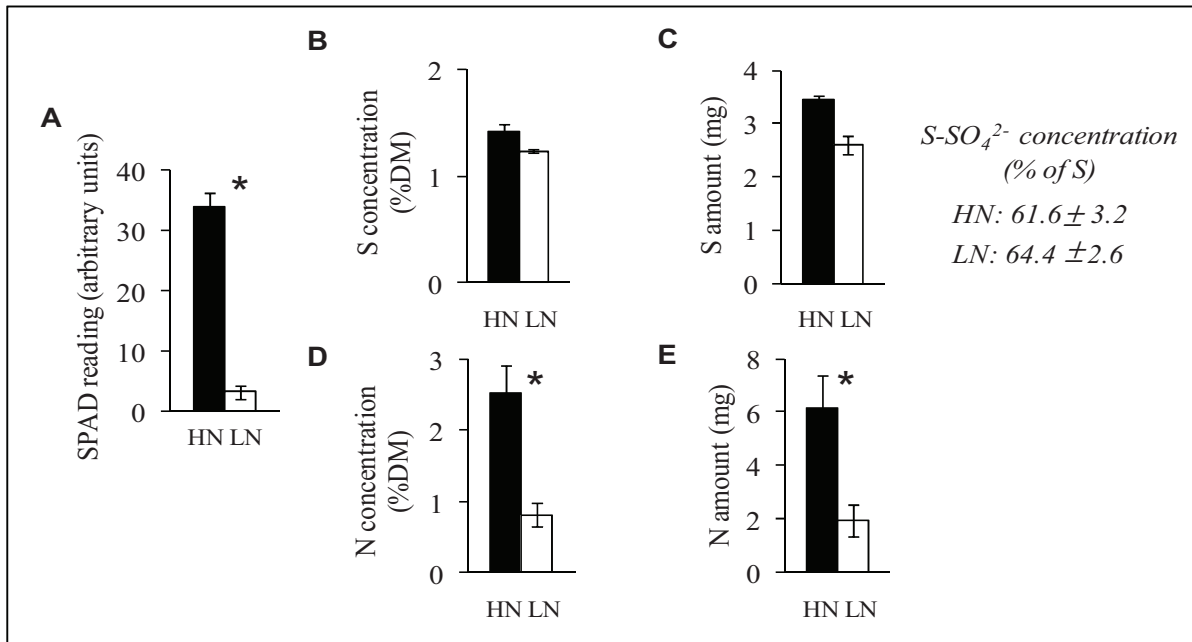
$$S_{tot,i,t} = \%S_{i,t} \times Md_{i,t}.$$

### II.4 Sulphate extraction and quantification

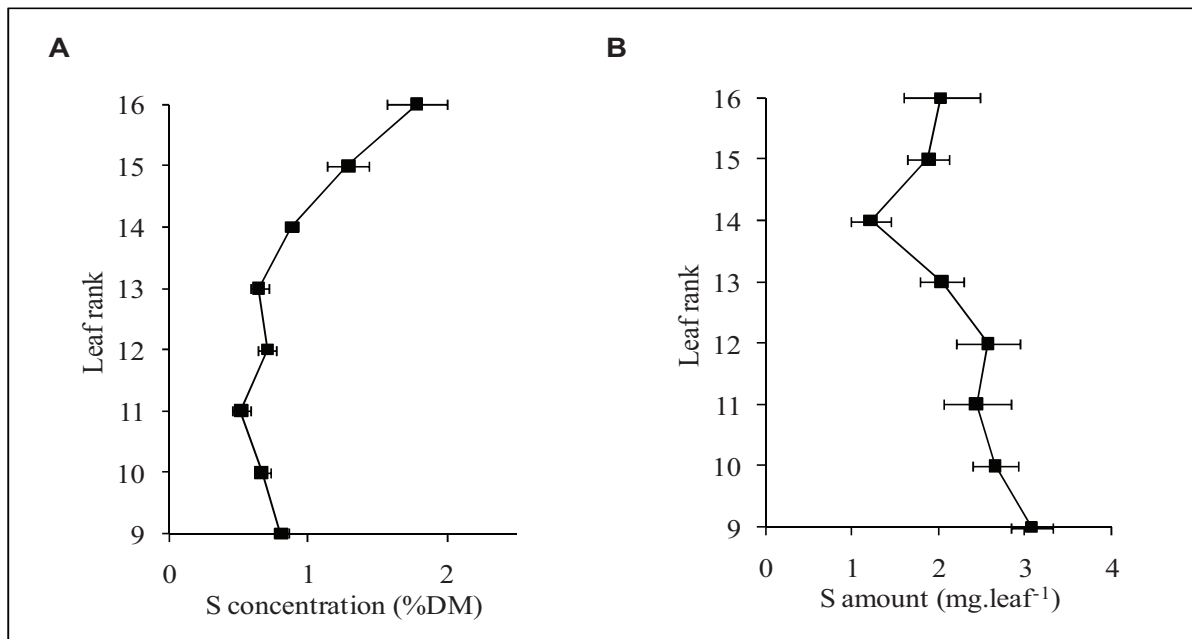
Sulphate was extracted from 45 mg of DM of leaf samples and was initially mixed with 2 mL of 50% ethanol. After incubation at 45°C for 1 h, the extract was centrifuged at 10000 g for 20 min and the supernatant was collected. This manipulation was reiterated on the pellet and the supernatant obtained was pooled with the previous one. The pellet was then re-extracted by two successive incubations with 2 mL of water at 95°C for 1 h. The extract was centrifuged at 10000 g for 20 min. All the supernatants were pooled and evaporated under vacuum (Concentrator Evaporator RC 10.22, Jouan, Saint-Herblain, France). The dry residue was re-suspended in 2 mL of ultra pure water and the sulphate concentration was determined by high performance liquid chromatography (HPLC, DX100, Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA).

### II.5 Statistics

The normality of the data was studied with the Ryan-Joiner test at 95%. Analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test to compare the means were performed using MINITAB13 (Minitab Inc, State College, PA, USA). When the normality law of the data was



**Figure IV-1 :** Changes in the chlorophyll (SPAD) (A), S concentration (B) and S amount (C), N concentration (D) and N amount (E) of the leaf rank #8 (Exp. G1) determined after 4 weeks of treatment under two levels of N fertilization : 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (HN), 0.4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (LN), in greenhouse-grown *Brassica napus* (cv. *Capitol*). Vertical bars indicate ± s.e. of the mean (n=3) when larger than the symbol. Asterisks indicate that mean values are significantly different at a given rank (p<0.05). The proportion of S-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> in total S was determined in leaf #8 of both N treatments and is indicated at the right of the graphic C (mean values are not significantly different).



**Figure IV-2 :** S concentration (A) and S amount (B) of fallen leaves in *Brassica napus* (cv. *Capitol*) grown in controlled conditions under high level of N (Exp. G2): 3.75 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (HN). Horizontal bars indicate ± s.e. of the mean (n=8) when larger than the symbol.

not respected, the non-parametric test of Kruskal-Wallis was carried out and followed by Mood's median test. Statistical significance was postulated at  $P < 0.05$ .

### III. RESULTS

The effect of contrasted levels of N fertilization on mobilization of S in old leaves was first investigated in controlled conditions. Additionally, an experiment was carried-out in field conditions with the aim of validating the data observed under controlled conditions.

#### III.1 Greenhouse experiments

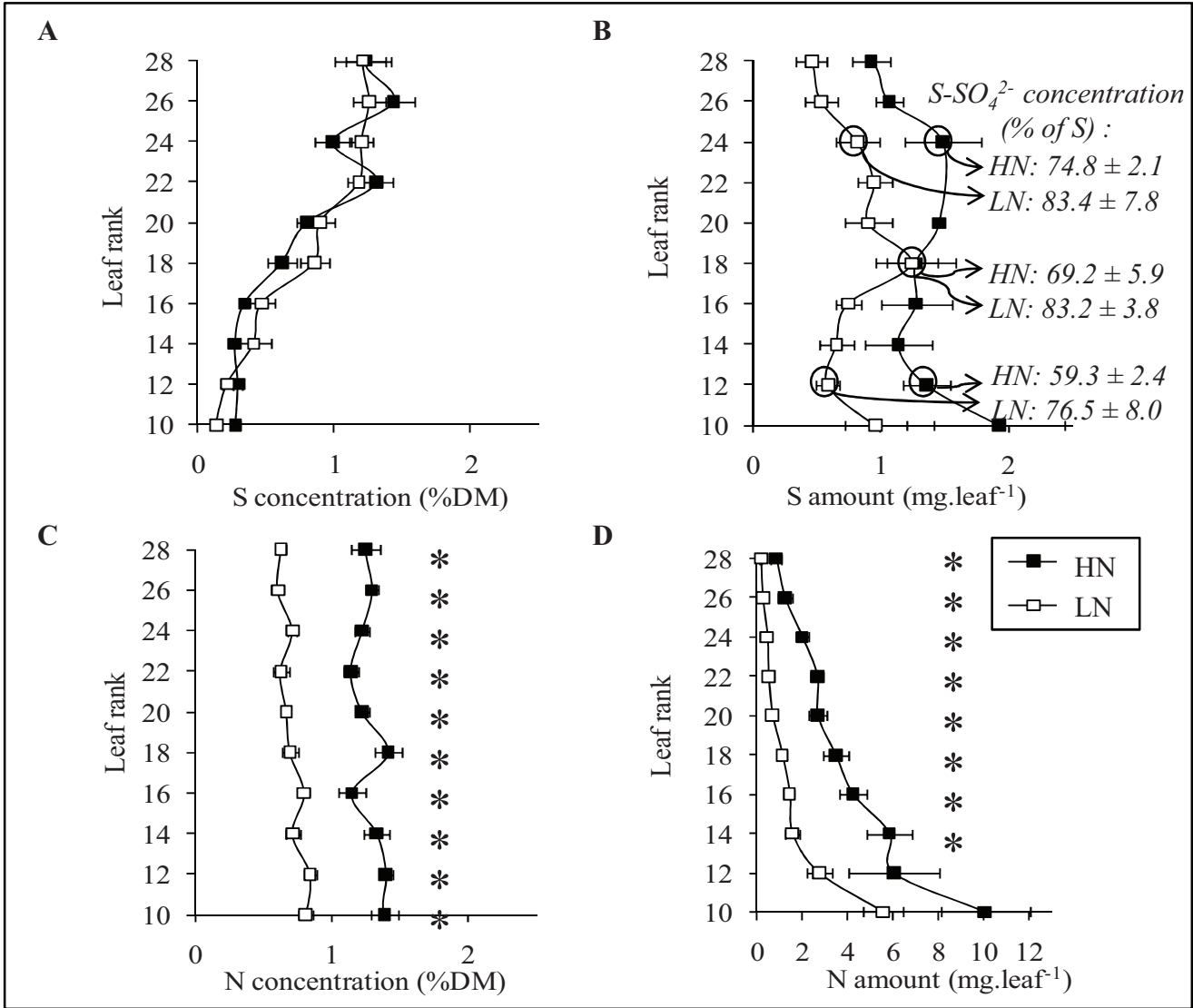
The effects of mineral N availability (control, HN: 4 mM, LN: 0.4 mM) on the residual S and N contents in leaves were followed in oilseed rape grown under greenhouse conditions (Exp. G1). Among the different leaf ranks, leaf rank #8 corresponded to the older fully expanded leaves that were still attached to the plant throughout Exp. G1. The fall of these leaves was registered after 4 weeks of LN treatment whereas they remained attached in HN conditions (data not shown).

##### *Chlorophyll and S and N concentrations in leaf #8 of plants submitted to different levels of N fertilization (Exp. G1)*

The effects of N restriction on the changes of the chlorophyll concentrations are presented in Figure IV-1. As expected, in LN plants, the chlorophyll concentration of leaf #8 strongly decreased to a value close to 0 after 4 weeks (*i.e.* at the date of the fall of the leaf) while it still reached 34 SPAD units in the control (Figure IV-1A).

S and N concentrations were monitored to determine the mobility of these elements during the ageing of leaf #8, which was a mature leaf likely to mobilize its S compounds during the experiment (Figures IV-1B and 1D). The lowest fertilization in nitrate (LN) did not affect significantly the S amount in leaf #8, which reached  $1.4 \pm 0.1$  % of DM at the end of the experiment in control plants (Figure IV-1B). The S amount tended to be lower in response to LN treatment (Figure IV-1C) but this decrease was not significant at  $p=0.05$ : it remained at an average value of  $2.6 \pm 0.2$  mg per leaf after 4 weeks of treatment.

After week 4 of the experiment, the large residual S amount observed in leaf #8 was mainly related to sulphate, which represented at least  $64.4 \pm 2.6$  % of the total S in LN



**Figure IV-3 :** S concentration (A) and S amount (B), N concentration (C) and N amount (D) of fallen leaves in field-grown *Brassica napus* (cv. *Capitol*) under two levels of N (Exp. F): LN (0 kg N ha<sup>-1</sup>), and HN (200 kg N ha<sup>-1</sup>). Horizontal bars indicate ± s.e. of the mean (n=6) when larger than the symbol. Asterisks indicate that mean values are significantly different at a given rank (p<0.05). The proportion of S-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> in total S was determined in the deaf leaf ranks #12, #18, #24 of both N treatments and is indicated at the right of the graphic 3B (mean values are not significantly different).



conditions (Figure IV-1). The nitrate availability (HN *versus* LN) had not significantly influenced the level of residual sulphate. The sulphate proportion in leaf #8 was similar the corresponding treatment in controlled conditions (Figure IV-1). In leaf #8 of HN plants, the N concentration represented  $2.5 \pm 0.4$  % of DM at the end of the experiment (Figure IV-1D). The amount of N decreased significantly in leaf #8 of the LN plants to reach a value 3-fold lower than in HN plants (Figure IV-1E).

#### *S concentrations in fallen leaves (Exp. G2)*

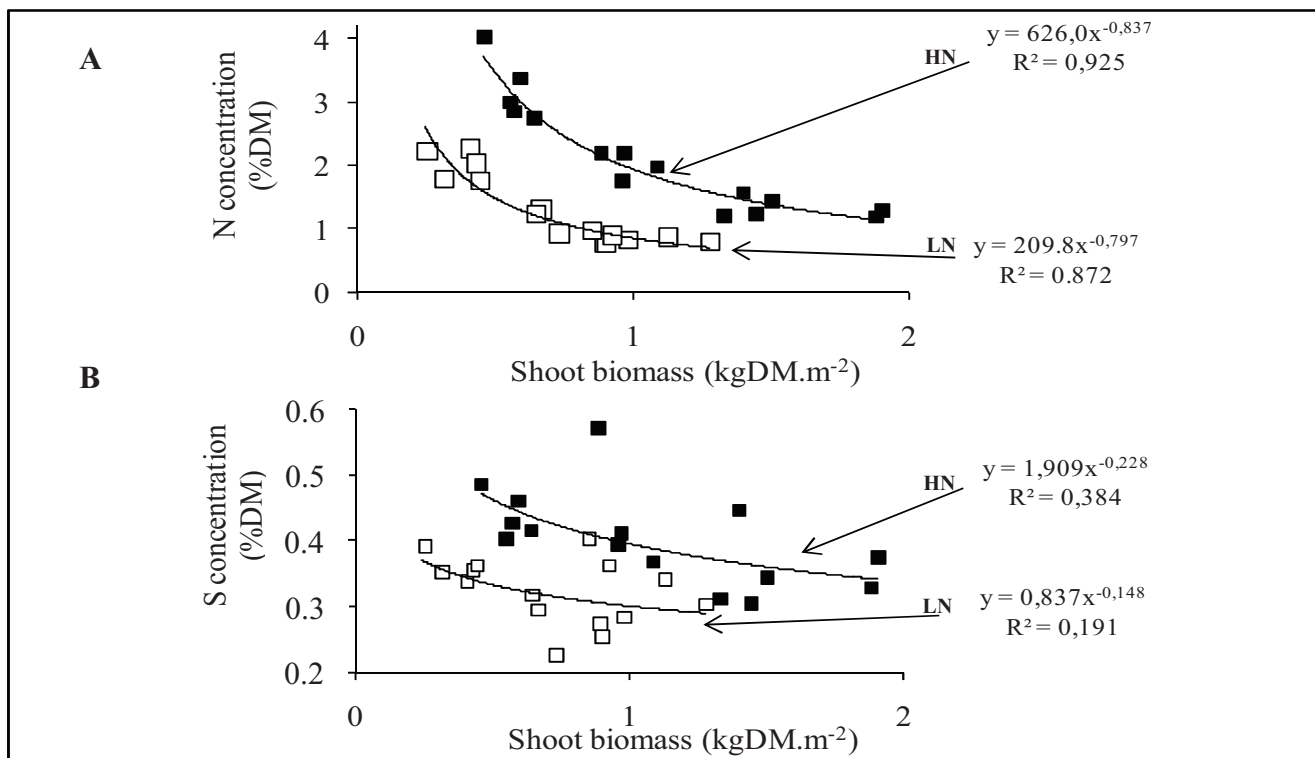
In order to verify the results observed in greenhouse experiment 1 (Exp. G1), the residual S concentrations of fallen leaves was followed (Figure IV-2A) in a second experiment carried-out under controlled conditions under sufficient N fertilization and using a different nutrient solution (Exp. G2). The S concentrations of fallen leaves showed two clusters of leaves in concordance with their nodal positions. Indeed, the average of residual S in the leaf ranks between #9 and #13 was  $0.66 \pm 0.06$  % of DM while it reached  $1.32 \pm 0.14$  % of DM in upper leaf ranks (Figure IV-2A). These upper leaves corresponded to the smallest leaves (with a leaf area smaller than  $6 \text{ cm}^2$ , data not shown) that appeared at the reproductive stage. As a consequence, the smaller biomass of these leaves in comparison to those between leaf ranks #9 and #13 resulted in an opposite trend in the amount of residual S (with an average of  $1.7 \pm 0.3$  mg in upper leaves *versus*  $2.6 \pm 0.3$  mg per leaf in basal nodal positions) (Figure IV-2B).

### **III.2 Field experiment (Exp. F)**

#### *S and N concentrations in fallen leaves*

The level of N fertilization did not have a significant effect on residual S concentrations, which was contrary to the findings for N concentrations in the fallen leaves (Figures IV-3A and 3C). The S concentrations of fallen leaves showed a large gradient of variation as a function of the leaf rank considered (from 0.1 to 1.5 % of DM) (Figure IV-3A). Considering the S concentrations, three clusters of leaves were distinguished: from leaf #10 to leaf#16 (with  $0.30 \pm 0.03$  %DM on average), from leaf #17 to leaf #22 (with  $0.91 \pm 0.10$  %DM on average) and from leaf #23 to leaf #28 (with  $1.31 \pm 0.27$  %DM on average).

In controlled (Figure IV-2B) and field (Figure IV-3B) conditions, the S amounts in the fallen leaves did not present spatial variations as observed for S concentrations. Compared to HN plants, the residual S amounts in fallen leaves tended to decrease in response to the LN



**Figure IV-4 :** S concentration (A) and N concentration (B) as function of accumulated dry matter in shoots in field-grown *Brassica napus* (cv. *Capitol*) under two levels of N (Exp. F): LN (0 kg N ha<sup>-1</sup>), and HN (200 kg N ha<sup>-1</sup>).

treatment but this decline was not significant. For instance, in leaf #24, the residual S amount represented  $0.82 \pm 0.17$  mg in the LN versus  $1.48 \pm 0.29$  mg in the HN plants ( $p = 0.0996$ ; Figure IV-3B).

The effect of N fertilization was observed markedly in the residual N concentration of the fallen leaves (Figure IV-3C). Whatever their nodal positions, leaves fell with an average N concentration of  $0.71 \pm 0.06$  %DM in LN plants and  $1.30 \pm 0.08$  %DM in HN plants. Compared to LN plants, the HN treatment led to a significant increase in the amount of residual N in fallen leaves from above the 14<sup>th</sup> rank (Figure IV-3D). LN and HN leaves of rank #14 fell with N amounts of  $1.54 \pm 0.35$  mg and  $5.83 \pm 1.01$  mg, respectively, whereas the upper leaf ranks fell with lower amounts of N. For example, LN and HN leaves of rank #24 fell with total N amounts of  $0.44 \pm 0.10$  mg and  $1.99 \pm 0.29$  mg, respectively (Figure IV-3D).

#### *Proportion of sulphate in residual S in leaves*

In Exp. F, the proportion of sulphate in fallen leaves from ranks #12, #18, and #24 representative of the three clusters of leaves distinguished according to S concentrations, was examined to verify if the large amount of S observed in these leaves (Figure IV-3B) was due or not due to sulphate sequestration. The large residual S amount observed in these leaves was mainly in sulphate form (higher than 59% of total S, Figure IV-3B). The sulphate proportion in the leaves of LN plants was not significantly different from HN conditions.

#### *S and N concentrations in shoot biomass during the cycle of development of oilseed rape*

Figure 4A gives the relationship between the N accumulation in shoot DM and the shoot DM dynamics for LN and HN plants in Exp. F. As expected, the relationship  $\%N = \alpha DM^{-\beta}$  was found and N concentrations were lower in LN conditions than in the control. In contrast to N concentration (Figure IV-4A), there was no decline of S as function of the increase in shoot DM (Figure IV-4B). Whatever the level of N fertilization, and contrary to the findings for N, there was no allometric relationship illustrated by an S dilution curve similar to that observed for N.

## **IV. DISCUSSION**

A major challenge of modern agriculture is to reduce the excessive input of fertilizers in parallel with an improvement of grain quality (particularly related with N and S balances)

without affecting yield. One way to achieve this goal is to improve the efficiency of N and S remobilization which has the advantage of recycling the endogenous N and S from vegetative parts of the plant for grain filling. This would contribute to plant N and S economy and limit exogenous nutrients demand. To improve the management of S and N in agricultural systems by optimizing inputs, the study of foliar recycling under different conditions of N fertilization is a prerequisite. The data presented in this paper focused on potential foliar S remobilization in relation to mineral N availability in oilseed rape. Studying the residual amounts of S in fallen leaves would constitute an accurate tool to determine the potential of recycling the foliar S, a major physiological trait that contributes to the improvement of the S use efficiency of oilseed rape.

#### **IV.1 S dynamic in old leaves and residual S in dead leaves**

While the poor valorisation of endogenous N (about 50% not exported to grains; Schjoerring *et al.*, 1995) can be related to a low N recycling from leaves especially during senescence (Malagoli *et al.*, 2005a) due to an incomplete degradation of proteins especially in the basal leaves (Gombert *et al.*, 2006, Desclos *et al.* 2009), the main causes of the low S use efficiency observed in oilseed rape (with an export of 10-30% of S taken up to grains, McGrath and Zhao, 1996; CETIOM, 2002) remain largely unclear. Although it was usually reported that S concentration in mature leaf reached 1-1.2% of leaf DM (Blake-Kalff *et al.*, 1998), our experiments under greenhouse or field conditions revealed that fallen leaves contain high concentration of residual S (up to 1.2 %DM). Under certain conditions and especially in the case of low N fertilization (Figures IV-1B, 3A and 3B), the residual S concentration could exceed the residual N concentration. Our results obtained from the field experiment were confirmed in a second field trial located in a different geographical site (located on a clay soil at Hérouvillette, France, 49°10' N, 0°15' W), with leaves that fell with S concentrations of  $0.51 \pm 0.07$  %DM for nodal positions ranging between the 8<sup>th</sup> and 18<sup>th</sup> leaf rank (data not shown). In contrast to S concentration, the N concentration detected in fallen leaves (Figures IV-3C) is very low regardless of N concentration usually observed in mature leaf of oilseed rape (3-7% of leaf DM, Malagoli *et al.*, 2005a). This clearly indicates that fallen leaves analyzed in the present study were submitted to senescence processes leading to the remobilization of foliar N compounds before their fall on soil. Based on these observations, it could be concluded that the high S concentration is observed in senescent

leaves and is not related to an untimely phenomenon of leaf abscission. The results presenting the profile of S concentration in leaves (Figure IV-3A) also confirmed those reported by Matula and Pechová (2002) showing that the concentration of S considerably increases in upper fully expanded leaves at final stages of growth development. Moreover, the amount of S in old or fallen leaves remained high whatever the level of N fertilization (Figures IV-1B, 2B and 3B). Contrary to S deprivation (Blake-Kalff *et al.*, 1998; Parmar *et al.*, 2007), the mineral N restriction did not provoke a significant decrease in the amount of foliar S (Figure IV-1C). The fact that the residual amount of S in fallen leaves of oilseed rape remains high whatever the nodal position or the conditions of culture considered (greenhouse or field conditions, adequate or low N fertilization), indicates that the low S use efficiency would be mainly related to a weak mobilization of S from ageing leaves.

## IV.2 Is the sulphate well remobilized from old leaves?

In oilseed rape, Blake-Kalff *et al.* (1998) reported that under optimal S supply, 70 to 90% of the total S was accumulated as sulphate in the middle and oldest leaves, whereas glutathione and glucosinolates accounted for less than 1% of the total S. These authors demonstrated that the major sources of S in plants would be sulphate and proteins (Blake-Kalff *et al.*, 2001). In agreement with the observations of Blake-Kalff *et al.* (1998), our data showed that the high residual S observed in dead leaves of oilseed rape grown under controlled or field conditions can be considered to be due to sulphate (Figures IV-1C and 3B). The high proportion of sulphate in the residual S of fallen leaves characterized in controlled and field conditions (Figures IV-1C and 3B) confirmed the sequestration of sulphate suggested by previous studies carried-out in oilseed rape under sufficient S fertilization (Hawkesford, 2000; Matula and Pechová, 2002). The level of nitrate fertilisation did not significantly affect the remobilisation of sulphate from leaves. Nevertheless, a weak tendency of decline in the amount of S in leaves was observed in response to mineral N restriction (Figures IV-1C and 3B). This slight decrease is not significant but would be due to a mobilization of organic S-compounds (amino acids, peptides or proteins) rather than sulphate remobilization. Indeed, the residual amounts of sulphate in leaves were not significantly reduced in response to mineral N restriction in controlled (with about  $2.05 \pm 0.16$  mg of  $\text{SO}_4^{2-}$  per leaf, regardless of mineral N availability; Figure IV-1C) and field conditions (with about  $1.03 \pm 0.20$  mg of  $\text{SO}_4^{2-}$  for example in the leaf #24, regardless of mineral N availability;

Figure IV-3B). Independent of the growth conditions, the S amounts in fallen leaves did not present spatial variations regardless to the nodal position contrary to S concentrations that increased in leaf ranks along a gradient from the bottom to the apex of oilseed rape (Figures IV-2A and 3A). This could be explained by high S concentrations in upper leaves associated with low biomass *versus* low S concentrations in basal leaves compensated by high biomass. Such a non-variable residual amount of S amount with respect to changes in the nodal position would be an indicator of over-fertilization in S.

### **IV.3 S and N dynamics in shoots of plants grown in conditions of sufficient S fertilization and effects of the level of N availability**

The lack of synchrony between S and N dynamics in shoots of oilseed rape (cultivated in classical conditions of S fertilization; Figure IV-4) underlines the concept that processes of endogenous S distribution in plants are different from N. The lack of a dilution curve of S in shoots (Figure IV-4B) is in accordance with the difference in the dynamics of N and S concentration in fallen leaves (Figures IV-3A and 3B). Contrary to field experiments conducted in the United Kingdom on *Brassica napus* cvs Libravo and Falcon by McGrath and Zhao (1996), the present survey did not demonstrate a significant lower allocation of S derived from uptake in conditions of low N fertilisation, in regard to the amount of S in old leaves. Nevertheless, a lower amount of S was effectively observed in young leaves from the LN conditions in the greenhouse experiment (Exp G1; data not shown).

The relationship between N concentration and shoot DM in field crops is well documented (Colnenne *et al.*, 1998; Justes *et al.*, 1994; Lemaire and Gastal, 1997; Marino *et al.*, 2004; Plénet and Lemaire, 2000). This allometric relationship was used to determine critical N dilution curves corresponding to the minimal concentrations of total N in shoots that produced the maximal shoot DM for a given time and field condition. The critical N dilution curves are used to determine the N plant status and serve as an accurate diagnosis of N nutrition by NNI calculation. For the same applications, it would be interesting to determine the S nutrition index (SNI) associated with critical S dilution curves. To our knowledge, the relationship between S concentration and shoot DM in field conditions is lacking in the literature. Concerning oilseed rape crops, an allometric relationship was reported between S concentrations and shoot DM of a spring oilseed rape cv. Tanto grown in pot experiments (Vong *et al.*, 2007) conducted for 63 days after germination. If this relationship could be

generalized to field conditions, shoot S concentration might be used as an index for the diagnosis of the plant S nutrition status. A decrease of S concentration in whole plants was generally observed from the stem elongation to flowering stages, a growth period corresponding to a rapid accumulation of shoot DM (McGrath and Zhao, 1996). To deepen S dynamics in relation to shoot biomass production in field conditions, a dilution curve was tested in the present study. It was not possible to establish a correlative curve presenting a hypothetical S dilution similar to N in shoot dry matter of winter oilseed rape in our field conditions (Figure IV-4B). Greenwood *et al.* (1991) and Lemaire and Gastal (1997) explained the dilution of N in shoot biomass by a decline in the proportion of the N-rich metabolically-active pool within the structural compartment of cells (relatively poor in N), but this would not be valid for S in field conditions. This is mainly related to the fact that sulphate is mainly stored in the vacuolar compartment and is retained long-term in leaf tissues.

In conclusion, different experiments were used in this survey to collect data on concentrations/amounts of total S in old or dead leaves of an oilseed genotype well documented in terms of N use efficiency (cv. Capitol, Malagoli *et al.*, 2004 and 2005; Gombert, 2006; Gombert *et al.*, 2006; Etienne *et al.*, 2007; Desclos *et al.* 2009). The results obtained underlined that S use efficiency can be improved by an optimization of the efficiency of foliar S redistribution. Oilseed rape crops, if well fertilized with S, would take up available sulphate in abundance until the latter stages of development. Additionally, it appeared that sulphate is highly accumulated in leaves but apparently not recycled during the final phase of leaf development, a physiological characteristic that would explain, at least in part, the absence of S dilution in shoot biomass (Figure IV-4B). This discordance between N and S mobilization can explain the difficulties previously reported in using a foliar N/S ratio as an indicator of S deficiency with a stable critical value (Blake-Kalff *et al.*, 2001). Considering the amount of S obtained from fallen leaves at the whole plant level and the number of plants per ha in the field experiment, the amount of S lost by fallen leaves can reach approximately  $22 \pm 0.7 \text{ kg S.ha}^{-1}$ , which should correspond to a large proportion of the  $30 \text{ kg S.ha}^{-1}$  applied by fertilization. Whatever the level of N fertilization, the residual S amount in fallen leaves on soil was high and sulphate was the main S component in dead leaves (Figures IV-1C and 3B).

An optimization of sulphate recycling from leaves would reduce S fertilization. The mobilization of sulphate from the vacuole to fulfil growth S requirements has been reported to be more efficient in leaves of oilseed rape submitted to S limitation (Blake-Kalff *et al.*, 1998; Hawkesford, 2000). Kataoka *et al.* (2004) suggested that SULTR4-type transporters actively

mediate the efflux of sulphate from the vacuole lumen into the cytoplasm. In oilseed rape, the dependency of mobilization of the vacuolar sulphate on the up-regulation of *Sultr4* genes, especially reported in response to S deprivation by Parmar *et al.* (2007), is still to be verified.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the French National Research Agency (ANR-COSMOS n°ANR-05-JC05-51097) and by a Ph.D. grant to Mrs Lucie Dubousset from the French Ministry of Research. The authors thank Mr Philippe Malagoli, Ms Carine Noquet, Ms Alexandra Bré, Mr Alain Ourry, Mr Frédéric Le Dily and Mr Philippe Lainé for their kind contributions in field experiments. They would like to thank also Ms Marie-Paule Bataillé and Mr Raphaël Ségura for their technical help in S and N analyses.



# Chapitre V

---

## Résultats

### Article 2 :

**Hypothèse :** La mobilisation foliaire du S, généralement accrue par une limitation en sulfate exogène, pourrait, indépendamment du stade de développement foliaire, être reliée à une surexpression de transporteurs de sulfate tonoplastiques tandis qu'une double limitation en S et en N pourrait entraîner une mobilisation du S protéique associée à une accélération de la sénescence foliaire.

**Objectif :** L'objectif est alors de rechercher quelle est la contribution de la mobilisation protéique au cours de la sénescence dans les mécanismes de remobilisation du S foliaire. Les effets d'une application de différents niveaux de fertilisation en S et/ou en N sur la mobilisation foliaire du sulfate et sur l'expression de transporteurs de sulfate tonoplastiques font également l'objet de cette étude.

**Méthodologie :** Notre démarche préliminaire a consisté à caractériser la progression spatio-temporelle de la sénescence séquentielle en réponse aux différents stress nutritionnels appliqués en conditions contrôlées. Afin de vérifier cette hypothèse, l'évolution des profils d'expression des gènes *SAG12* et *Cab* a été utilisée comme indicateur moléculaire de la vitesse de progression de la sénescence foliaire. Pour suivre les processus de mobilisation des composés soufrés en réponse à des limitations en S et/ou N, nous avons utilisé au préalable le traceur isotopique stable  $^{34}\text{S}$  sur une longue période de croissance suivie d'une période de chasse à partir de l'application des limitations en S et/ou en N. Aussi, pour mieux appréhender les mécanismes de mobilisation du sulfate en réponse aux différents traitements, un suivi de l'expression des transporteurs de sulfate vacuolaires identifiés chez *Brassica napus* L. a été effectué.

**Résultats :** Contrairement à la carence en N, une restriction en S appliquée au stade rosette ne provoque pas d'accélération de la sénescence foliaire et n'affecte pas significativement la croissance des plantes. Les quantités de S,  $^{34}\text{S}$  et  $\text{SO}_4^{2-}$  dans les vieilles feuilles ont rapidement diminué. Le principal composé soufré mobilisé en réponse à une carence en S est le sulfate. Cette mobilisation est associée à de fortes expressions de transporteurs de sulfate vacuolaires (*BnSultr4;1* et *BnSultr4;2*) dont les profils d'expressions sont également dépendants de l'âge de la feuille et de la disponibilité en N.

## **CHAPITRE V**

# **Etude de l'effet d'une limitation en sulfate couplée ou non à une limitation en nitrate appliquées au stade rosette sur la mobilisation du S et N foliaire**

---

**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.**

L. Dubousset<sup>1</sup>, M. Abdallah<sup>1</sup>, A.S. Desfeux<sup>1</sup>, P. Etienne<sup>1</sup>, F. Meuriot<sup>1</sup>, M.J. Hawkesford<sup>2</sup>, J. Gombert<sup>1</sup>, R. Ségura<sup>1</sup>, M-P. Bataillé<sup>1</sup>, S. Rezé<sup>1</sup>, J. Bonnefoy<sup>1</sup>, A.F. Ameline<sup>1</sup>, A. Ourry<sup>1</sup>, F. Le Dily<sup>1</sup>, J.C. Avice<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>*INRA, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutriments N.C.S., Esplanade de la Paix, F-14032, Caen, France.*

<sup>2</sup>*Plant Science Department, Rothamsted Research, Harpenden, Hertfordshire, AL5 2JQ, UK*

**Key words:** *Brassica napus*, sulphur limitation, leaf senescence, <sup>34</sup>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> labelling, S compounds recycling, Group 4 sulphate transporters

**ABSTRACT**

The impact of sulphur limitation on the remobilization of endogenous S compounds during the rosette stage of oilseed rape and the interactions with N availability on these processes were examined using a long term  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  labelling method combined with a study of leaf senescence progression (using *SAG12/Cab* as a molecular indicator) and gene expression of the transporters, *BnSultr4;1* and *BnSultr4;2*, involved in vacuolar sulphate efflux. After 51 days on hydroponic culture at 0.3 mM  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  (1 atom % excess), the labelling was stopped and plants were subject for 28 days to High S-High N (control), Low S-High N (LS-HN) or Low S-Low N (LS-LN) conditions. Compared to the control, LS-HN plants showed delayed leaf senescence, and whilst the shoot growth and the foliar soluble protein amounts were not affected, S,  $^{34}\text{S}$  and  $\text{SO}_4^{2-}$  amounts in old leaves declined rapidly and were associated with up-regulation of *BnSultr4;1*. In LS-LN plants, shoot growth was reduced, leaf senescence was accelerated and the rapid S mobilization in old leaves was accompanied by decreased  $^{34}\text{S}$  and  $\text{SO}_4^{2-}$ , higher protein mobilization and up-regulation of *BnSultr4;2*, but without any change of expression of *BnSultr4;1*. The data suggest that to sustain the S demand for growth under S restriction (i) vacuolar  $\text{SO}_4^{2-}$  is specifically remobilized in LS-HN conditions without any acceleration of leaf senescence, (ii)  $\text{SO}_4^{2-}$  mobilization is related to an up-regulation of *BnSultr4;1* and/or *BnSultr4;2* expression, and (iii) the relationship between sulphate mobilization and up-regulation of expression of *BnSultr4* genes is specifically dependant on the N availability.

## I. INTRODUCTION

Sulphur (S) is an essential macroelement for crops worldwide, available to plants mainly as sulphate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) in soil and as sulphur dioxide in the atmosphere. The decline of industrial emissions and subsequent deposition of S on agricultural land that has occurred for about twenty years has increased the risk of S-depletion of soils with concomitant reductions of agronomic performances for many crops. As with other plants of the *Brassica* family, oilseed rape (*Brassica napus* L.) is particularly demanding for S (McGrath and Zhao, 1996), and is very sensitive to S deprivation with consequences for seed quality and yield (Janzen and Bettany, 1984; Scherer, 2001). S deficiency also influences lipid and protein composition of seeds, impacting on nutritional quality. In response to a limitation of sulphur supply, the hypothetical initial plant responses involve optimization of uptake and utilization of sulphate, accompanied by an increase of remobilization of S reserves from vegetative tissues and their subsequent redistribution towards growing tissues (Hawkesford and De Kok, 2006).

The impacts of S deprivation on seed quality and yield have been shown to depend on N supply (Janzen and Bettany, 1984). In addition, S availability may influence N use efficiency (NUE) of oilseed rape and *vice versa* (Schnug *et al.*, 1993; Fismes *et al.*, 2000), indicating that mineral S and N availabilities closely interact with S and N management by the plant (Kopriva and Rennenberg, 2004). In *Arabidopsis thaliana*, the plant model which has a particular relevance for *Brassica*, recent studies at metabolome and transcriptome levels have confirmed that S deprivation leads to modified S and N metabolism. For example, Nikiforova *et al.* (2004, 2005) have shown a significant disruption of N metabolism in response to S deficiency leading to nitrate, serine, tryptophan and *O*-acetyl serine (OAS) accumulation, whereas cysteine, S-adenosyl methionine (SAM), and glutathione contents decreased. Cysteine, the final product of the reductive assimilation of S, and the result of the incorporation of sulphide with OAS by cysteine-synthase complex, is the convergent point of N and S metabolism. Numerous genes are regulated in response to S deficiency (Nikiforova *et al.*, 2003; Maruyama-Nakashita *et al.*, 2003; Hirai *et al.*, 2003, 2004, 2005) and among these genes, the steady-state levels of transcripts for sulphate transporters, ATP sulphurylase, 5'-adenylphosphosulphate (APS) sulphotransferase, and nitrilase increased in response to S starvation. In addition it was shown that S deficiency down-regulated the expression of nitrate reductase and plastid glutamine synthase genes in *Nicotiana tabacum* (Migge *et al.*, 2000). Moreover, in *Brassica*, a decrease of sulphate availability resulted in an increase in abundance of several sulphate transporter transcript levels (Buchner *et al.*, 2004; Parmar *et al.*, 2007). An

up-regulation of group 1 transporters (high affinity type, see Hawkesford, 2003) in response to S deprivation was observed, particularly in the young leaves, whilst there was no induction in old leaves. In contrast, expression of *Sultr4;1* a gene encoding a group 4 sulphate transporter involved in the efflux of sulphate from the vacuole in *Arabidopsis thaliana* (Kataoka *et al.*, 2004), was up-regulated only in middle aged leaves of *Brassica napus* (Parmar *et al.*, 2007). The increase of gene expression as observed in response to S limitation suggests a mechanism of adaptation facilitating the utilization of stored S reserves. Kataoka *et al.* (2004) suggested that the SULTR4;1 transporter substantially prevented excessive accumulation of sulphate in the vacuoles of root xylem parenchyma cells, while the second isoform, SULTR4;2, was suggested to have a similar but supplementary function. In seedlings of *Arabidopsis thaliana*, the supplied sulphate was retained in the root tissue of the *sultr4;1 sultr4;2* double knockout mutant (Kataoka *et al.*, 2004). These authors suggested that SULTR4-type transporters, particularly SULTR4;1, actively mediate the efflux of sulphate from the vacuole lumen into the cytoplasm. In oilseed rape, Parmar *et al.* (2007) also reported that in response to S deprivation, expression of SULTR4-group transporters is induced in roots and in leaves, which is concomitant with a decrease of the respective sulphate concentrations. In leaves, a marked increased mRNA abundance of *BSultr4;2* was observed initially mainly in the young leaves, and finally in the older leaves, while the *BSultr4;1* induction took place in mature and old leaves (Parmar *et al.* 2007). The mobilization of sulphate from the vacuole to fulfil growth S requirements has been reported to be a slow process in mature leaves of oilseed rape (Blake-Kalff *et al.*, 1998; Hawkesford, 2000) except in the case of S limitation. The dependency of mobilization of the vacuolar sulphate on the up-regulation of *Sultr4;1* and *Sultr4;2* is still to be verified.

In oilseed rape, leaves represent a major store of nutrients for growing tissues which may be remobilized, potentially mediated by senescence processes. The leaves appearing during the rosette stage play a crucial role for recycling foliar compounds to sustain seed filling during the reproductive stage and therefore contribute to the maintenance of the grain yield of oilseed rape. For instance, Noquet *et al.* (2004) have reported that the ablation of 50 % of the rosette leaves present at the beginning of the reproductive stage (*i.e.* bolting stage) results in a 30% decrease of the seed yield in oilseed rape. Under field conditions, the rosette stage is a vegetative period of the ontogenic cycle where the availability of mineral S would be determined by soil S availability and winter rainfall patterns. Therefore, in the absence of additional S fertilization, oilseed rape may be dependent on early S acquisition and the

consequent S reserves accumulating in the leaves at the vegetative stages, along with a capacity to efficiently remobilize these reserves and other endogenous S compounds to sustain the growth of young tissues at later stages of development.

Sunarpi and Anderson (1997a, b) have reported that the response of soybean (*Glycine max*) to S deficiency, in terms of remobilization of S compounds stored in leaves, was influenced by mineral N availability. Low levels of N nutrition promoted the loss of S from mature leaves to the benefit of the developing leaves, while high levels of nitrate inhibited this process. These data suggested that mineral N availability must be taken into account when monitoring the responses of plants to S deficiency. In oilseed rape, Blake-Kalff *et al.* (1998) reported that under optimal S supply, 70% to 90% of the total S in the middle and oldest leaves accumulated as sulphate, whereas glutathione and glucosinolates accounted for less than 1% of the total S. These authors demonstrated that the major sources of S during S deficiency would be sulphate reserves and existing proteins. Plants grown on nutrient solution containing low S and low N showed fewer deficiency symptoms than plants grown on solutions containing low S and high N; this effect of mineral N availability was largely explained by differences in growth rate (Blake-Kalff *et al.*, 1998). In spite of these observations, in oilseed rape, there have been few published studies to determine if the S remobilization observed in response to sulphate deficiency (i) is related to the enhancement of leaf senescence processes as classically observed in case of mineral N deficiency (Smart *et al.*, 1995; Gombert *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2007) and (ii) differs as a function of mineral N availability.

The main target of the present study was to determine the impact of reduced sulphate supply, combined with variable nitrate availability, on the S remobilization from expanding to older leaves, previously suggested to export large amount of S, at the rosette stage (Parmar *et al.*, 2007). The impact of sulphate supply on S mobilisation and leaf senescence in low S - high N (LS-HN) conditions was compared to high S – high N (HS-HN) and to low S – low N (LS-LN). The two key variables were the level of S (between HS-HN and LS-HN) and the level of N associated with the limitation in S (between LS-HN and LS-LN). To evaluate the level of S remobilization from expanding and older leaves, a method was developed for long term steady state  $^{34}\text{S-SO}_4^{2-}$  pulse-labelling, consisting of a  $^{34}\text{S-SO}_4^{2-}$  application at the beginning of vegetative development for a period of 51 days, allowing analysis of the dynamics of mobilization of S compounds during the following chase period of 28 days. This type of homogeneous labelling added additional resolution to previous studies by  $^{35}\text{S}$  pulse-

chase, for instance in soybean (Sunarpi and Anderson, 1997a, b). In addition, to verify whether S recycling in response to S deficiency is associated with foliar senescence processes, leaf senescence progression was determined with a molecular indicator of leaf senescence status (*SAG12/Cab*), which was developed by Gombert *et al.* (2006) and Etienne *et al.* (2007) for oilseed rape. As sulphate is mainly stored in the vacuole and this represents the most important source of S in leaves of oilseed rape (Blake-Kalff *et al.*, 1998), the survey of S redistribution was combined with a study of the expression levels of the *BnSultr4;1* and *BnSultr4;2* genes, which encode the sulphate transporters involved in efflux of sulphate from the vacuole (Kataoka *et al.*, 2004).

## II. MATERIALS AND METHODS

### II.1 Plant culture and applications of restricted S and N supply

Seeds of *Brassica napus* L. cv. Capitol were sterilised with 80% ethanol for 30 s followed by treatment with 20% sodium hypochlorite for 20 min and several washes in demineralised water. The seeds were germinated and grown in hydroponic solution under greenhouse conditions: fourteen 5 days-old seedlings were transplanted under hydroponic conditions into 20 l plastic tank. The aerated nutrient solution contained 0.40 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.0 mM KCl, 3.0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.15 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.2 mM Fe-Na EDTA, 14  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 5.0  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4$ , 3.0  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 0.7  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ , 0.7  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ , 0.1  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ , and was renewed every 7 d. This solution was supplied with 1 mM  $\text{KNO}_3$ , 0.3 mM  $\text{MgSO}_4$  two times per week to maintain concentrations at 1 mM nitrate and 0.3 mM sulphate. During this period of growth (51 days), plants were supplied with  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  (1 atom% excess) in order to obtain plants with homogeneous  $^{34}\text{S}$  labelling. Afterward the plants were isolated (one plant per tank) and cultivated for the chase period in a 4 l tank of the aerated nutrient solution without addition of  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ . Three different levels of mineral S or N were applied during 28 days: 0.3 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1 mM  $\text{KNO}_3$  corresponding to High S and High N level (HS-HN treatment *i.e.* control plants); 15  $\mu\text{M}$   $\text{MgSO}_4$ , 1 mM  $\text{KNO}_3$  corresponding to Low S and High N level (LS-HN treatment); and, 15  $\mu\text{M}$   $\text{MgSO}_4$ , 250  $\mu\text{M}$   $\text{KNO}_3$  corresponding to Low S and Low N level (LS-LN treatment). These nutrient solutions were renewed every 7 days. During the whole

experiment, the natural light was supplemented with green power Philips lamps ( $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of photosynthetically active radiation at the canopy) for  $16 \text{ h d}^{-1}$ . The thermoperiod was  $20^\circ\text{C}$  (day) and  $15^\circ\text{C}$  (night).

## II.2 Tissue sampling

Four plants of each of the three treatments (HS-HN, LS-HN, and LS-LN plants) were harvested every week and separated into the whole root system, the stem, the petiole and the leaf blade of leaves, after the determination of the relative chlorophyll concentration using the non-destructive SPAD (Soil Plant Analysis Development) chlorophyll meter (Minolta, SPAD-502 model). Each data point represents the average of eight independent measurements for each leaf. One sub-sample of each plant fraction was weighed, freeze-dried, reweighed for dry weight determination, and then ground to a fine powder for S and N analyses. Other subsamples were immediately frozen in liquid nitrogen after harvest and then stored at  $-80^\circ\text{C}$  for subsequent RNA, protein and sulphate extractions.

## II.3 S, $^{34}\text{S}$ and N analysis

Samples were freeze-dried, weighed and placed into tin analysis capsules. Both total S and N contents in the plant samples were determined with a continuous flow isotope mass spectrometer (Isoprime, GV Instruments, Manchester, UK) linked to an analyser (EA3000, EuroVector, Milan, Italy). For each sample, the  $\delta^{34}\text{S}$  were collected and data were normalized using V-CDT an internationally accepted isotope standard for S analysis. Stable isotope abundance ( $A$ ) was calculated with the  $\delta^{34}\text{S}$  as follows:

$$A = 100 \times \frac{R_{\text{sample}}}{(R_{\text{sample}} + 1)}$$

$$R_{\text{sample}} = (\delta^{34}\text{S} \times 0.04415206 / 1000) + 0.04415206$$

To determine the  $^{34}\text{S}$  amount in excess, the natural isotope abundance of 4.2549% was withdrawn to the value of  $A$  before the multiplication by the DW of the leaf blade.



## II.4 Soluble proteins and sulphate extraction and quantification

Soluble proteins were extracted from 200 mg FW of frozen leaf blade samples, mechanically crushed with 500  $\mu$ l of citrate Na-phosphate buffer (20 mM citrate and 160 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 6.8). The homogenate was centrifuged at 12000 g, 4°C for 1h and the resulting supernatant was used to determine the concentration in soluble proteins by protein-dye staining (Bradford, 1976), using bovine serum albumin (BSA) as standard, with 3 replications for each sample.

Sulphate was extracted from 45 mg DW of leaf blade samples, mechanically crushed by two successive incubations with 2 ml of ethanol 50%, at 45 °C for 1h, centrifuged at 10000 g for 20 min and two incubations with water, at 95 °C for 1h, centrifuged at 10000 g for 20min. The supernatants were pooled and evaporated under vacuum (Concentrator Evaporator RC 10.22, Jouan, Saint-Herblain, France). The dry residue was re-suspended in 2 ml of ultra pure water and the sulphate concentration was determined by high performance liquid chromatography (HPLC, ICS3000, Dionex *Corp.*, Sunnyvale, CA, USA).

## II.5 RNA extraction

Total RNA was extracted from 200 mg of leaf blade fresh matter. Frozen samples were ground to a powder with a pestle in a mortar containing liquid nitrogen. The resulting powder was suspended in 750  $\mu$ l extraction buffer (0.1 M Tris, 0.1 M LiCl, 0.01 M EDTA, 1% SDS (w/v), pH 8) and 750  $\mu$ l of hot phenol (80°C, pH 4). This mixture was vortexed for 30 sec. and after addition of 750  $\mu$ l of chloroform/isoamylalcohol (24:1), the homogenate was centrifuged at 15 000 g (5 min., 4°C). The supernatant was transferred into 4 M LiCl solution (w/v) and incubated overnight at 4°C. After centrifugation (15 000 g, 30 min, 4°C), the pellet was suspended in 250  $\mu$ l of sterile water. Fifty microliters of 3 M sodium acetate (pH 5.6) and 1 ml of 96% ethanol were added to precipitate the total RNA for 1 h at -80°C. After centrifugation (15 000 g, 20 min., 4°C), the pellet was washed with 1 ml of 70% ethanol, then centrifuged at 15 000 g for 5 min. at 4°C. The resulting pellet was dried for 5 min at room

temperature and re-suspended in sterile water containing 0.1% SDS and 20 mM EDTA. Quantification of total RNA was performed by spectrophotometer at 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq, France) before Reverse Transcription (RT), semi-quantitative and quantitative PCR (Q-PCR) analyses.

## II.6 Reverse Transcription (RT) and semi-quantitative PCR analysis

For RT, 1 µg of total RNA was converted to cDNA with an "iScript cDNA synthesis kit" according to the manufacturer's protocol (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). PCRs were obtained using specific primers for *Brassica napus CabLHB1B2* gene (Accession no: DQ355993) (forward primer: 5'-GGCAGCCCATGGTACGGATC-3' and reverse primer 5'-CCTCCITCGCTGAAGATCTGT-3'), and primers shared by *SAG12-1* (Accession no: AF089848) and *SAG12-2* (Accession no: AF089849) genes of *Brassica napus* (forward primer: 5'-GGCAGTGGCACACCAMCCGGTTAG-3' and reverse primer: 5'-AGAAGCMTTCATGGCAAGACCAC-3'). *EF1-α* gene (Accession no: DQ312264), was used as an internal control gene (Nicot *et al.*, 2005; Etienne *et al.* 2007) and was amplified using forward primer: 5'-TTTCGAGGGTGACAACATGA-3' and reverse primer 5'-CCGTTCCAATACCACCAATC-3'. PCRs were performed with Qbiogene Taq polymerase (MP Biomedicals, Illkirch, France) according to the manufacturer's protocol. The amplification program was: 1 cycle at 95 °C for 5 min, 20 (*Cab*), 24 (*SAG12*) or 28 (*EF1-α*) cycles including a denaturing step at 95 °C for 45 sec, a primer's hybridization step at 58 °C for 45 s and an amplification step at 72 °C for 1 min. Each PCR reaction was ended with one cycle at 72 °C for 10 min. Three single 267, 161 and 164 bp cDNAs were amplified for *SAG12*, *Cab* and *EF1-α* genes, respectively, and the identity of each fragment was checked by sequencing (Biofidal, Vaulx-en-Velin, France). For all RT-PCR reactions, the *EF1-α* gene was used as cDNA synthesis and amplification control (Nicot *et al.*, 2005; Etienne *et al.*, 2007). PCR products were separated by electrophoresis through 1% agarose gel. The steady-state level of transcripts was estimated by measurement of signal intensities using Biocapt software (Vilber Lourmat, Marne-La-Vallée, France) after normalization with the *EF1-α* gene. From each sample, three RT reactions were made, followed by two independent PCRs, and the corresponding data did not show significant variation of the steady state transcript level, indicating that the PCR method was reproducible.

## II.7 Study of leaf senescence progression using SAG12/Cab indicator

The rate of senescence progression was studied using the method developed by Gombert *et al.* (2006). Every week, for each plant, *SAG12* and *Cab* gene expression levels were followed as a function of leaf rank, where the *SAG12* and *Cab* gene expression levels were expressed as a percentage of the maximum of both transcripts obtained in overall leaf ranks studied during the experiment (see supplemental data #1). According to Gombert *et al.* (2006), the last theoretical senescent leaf rank was determined at the intersection point corresponding to the concomitant up and down regulation of *SAG12* and *Cab* genes. The maximal and minimal values of the intersection point were determined geometrically, using the extreme values of *SAG12* and *Cab* gene expression levels (see supplemental data #1). Analysis was first performed on leaf ranks # 6, 8, 10, 12 for each date of harvest and on leaf ranks # 7, 9 when necessary. Thereafter, changes of these theoretical leaf ranks were expressed as a function of time and the corresponding values presented a linear relationship, where the value of the slope (illustrated in Figure V-2) indicates the rate of the leaf senescence progression in response to treatments.

## II.8 Relative expression of BnSultr4 and BnSultr1 genes using Q-PCR

For Q-PCR amplification, primers of *BnSultr4* encoding vacuolar sulphate transporters in *Brassica napus* were designed from the *BnSultr4;1* sequence (Accession no: AJ416461), and from the *BoSultr4;2* sequence (Accession no: AJ555124). The *BnSultr4;2* sequence amplified corresponds to Accession no: FJ688133. Q-PCR amplifications were performed by using *BnSultr4;1* forward primer: 5'GACCAGACCCGTTAAGGTCA-3' and reverse primer: 5'TTGGAATCCATGTGAAGCAA-3', *BnSultr4;2* forward primer: 5'AGCAAGATCAGGGATTGTGG-3' and reverse primer: 5'TGCAACATTTGTGGGTGTCT-3', *BnSultr1;1* forward primer: 5'-AGATATTGCGATCGGACCAG -3' and reverse primer: 5'-GAAAACGCCAGCAAAGAAAG -3', and *BnSultr1;2* forward primer: 5'-GGTGTAGTCGCTGGAATGGT -3' and reverse primer: 5'-

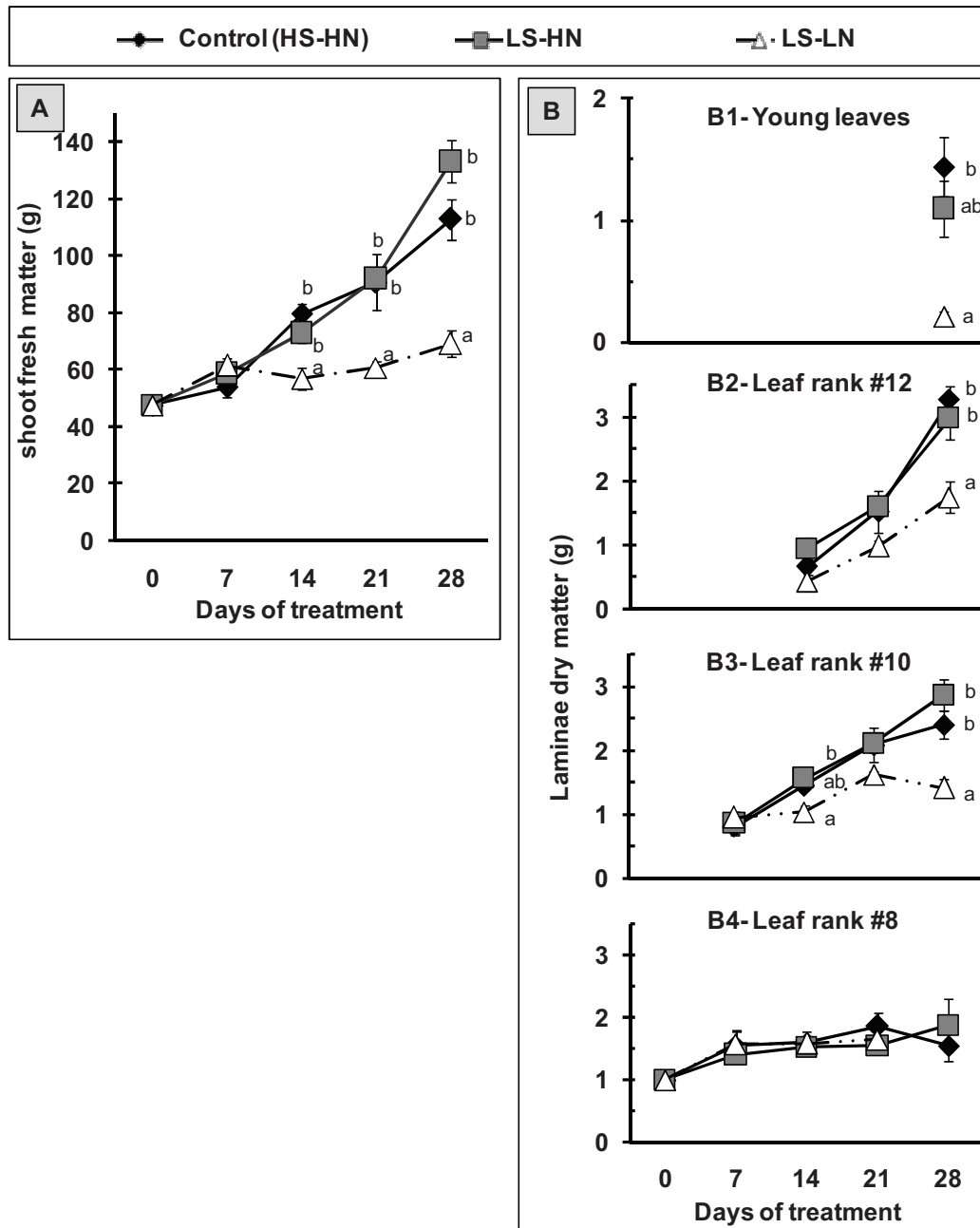
AACGGAGTGAGGAAGAGCAA -3'. As indicated for semi-quantitative PCR analysis, *EF1- $\alpha$*  gene (Accession no: DQ312264), was used as an internal control gene and was amplified using the primers described above. Q-PCR reactions were performed with 4  $\mu$ L of 100 $\times$  diluted cDNA, 500 nM of primers, and 1 $\times$  SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad) in a ChromoFour System (Bio-Rad). For each pair of primers, a threshold value and PCR efficiency have been determined using a cDNA preparation diluted over 10-fold. For both pairs of primers, PCR efficiency was around 100%. The specificity of PCR amplification was examined by monitoring the presence of the single peak in the melting curves after Q-PCR reactions and by sequencing the Q-PCR product to confirm that the correct amplicons were produced from each pair of primers (Biofidal). In addition, Blastn analysis ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi)) was performed in order to check the correct amplification of the target cDNA, *BnSultr4;1* and *BnSultr4;2*. For each sample, the subsequent Q-PCR reactions were performed in triplicate and the relative expression of the *BnSultr4* transporters in each sample was compared to the control sample (corresponding to control plants (HS-HN) at day 7) and was determined with the delta-delta Ct method using the following equation:

$$\text{Relative expression} = 2^{-[\Delta\text{Ct sample} - \Delta\text{Ct control}]}, \text{ with } \Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{BnSultr4;1} - \text{Ct}_{EF1-\alpha}$$

where Ct refers to the threshold cycle determined for each gene in the exponential phase of PCR amplification. Using this analysis method, relative expression of the *BnSultr4;1* gene in the control sample was equal to one ( $2^0$ ), by definition (Livak and Schmittgen, 2001).

## II.9 Statistics

The normality of the data was studied with the Ryan-Joiner test at 95%. Analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test to compare the means were performed using MINITAB13 on *Windows* (Minitab Inc, State College, PA, USA). When the normality law of data was not respected, the non-parametric test of Kruskal-Wallis was done. Statistical significance was postulated at  $P < 0.05$ .



**Figure V-1 :** Changes in the fresh matter of oilseed rape shoots (A) and in dry matter of the leaf blade of the younger leaves (B1) and of leaf ranks #12 (B2), #10 (B3), #8 (B4) of oilseed rape in control plants (HS-HN), sulphate limited plants (LS-HN) and combined sulphate and nitrate limited plants (LS-LN) for the 28 days of treatments. Vertical bars indicate  $\pm$  s.e. of the mean ( $n=4$ ) when larger than the symbol. Different letters indicate that mean values are significantly different at a given date ( $p < 0.05$ ).

### III. RESULTS

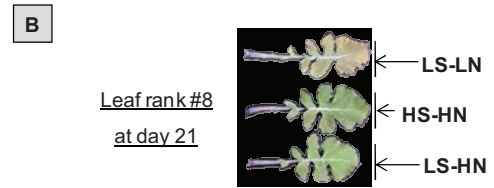
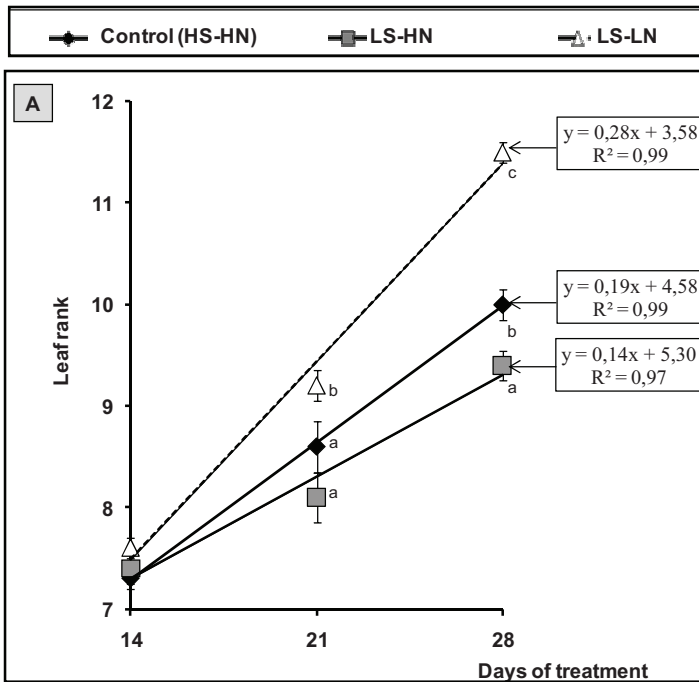
#### III.1 Effects of limited sulphate supply on shoot growth in the presence and absence of nitrate limitation

The dynamics of shoot fresh biomass production in control (HS-HN) and LS-HN plants were similar and biomass increased during the experiment (Figure V-1A). Compared to the control, the LS-LN treatment showed significantly reduced shoot fresh biomass production after 14 days of treatment. After 28 days of experiment, the shoot fresh matter production reached 69.2 g.plant<sup>-1</sup> in the LS-LN plants while it was 112.9 g.plant<sup>-1</sup> in the control conditions (Figure V-1A).

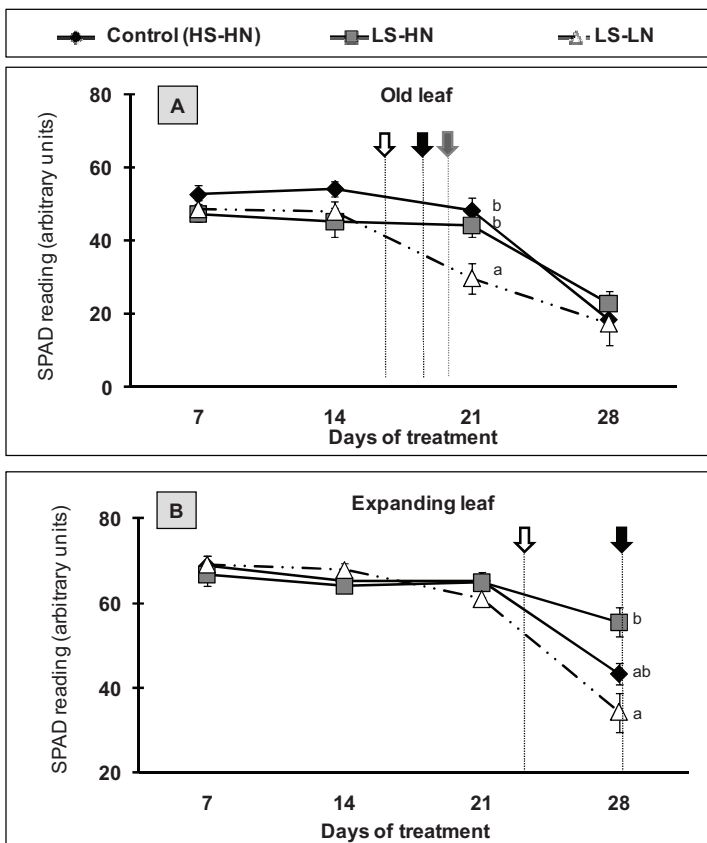
The dry biomass of leaf blade in leaves at different nodal positions (*i.e.* at contrasting stages of leaf development) was monitored in response to different mineral S and N treatments (Figure V-1B). Whatever the treatment, the biomass of the leaf blade of expanding leaves (young leaves and expanding leaf ranks #10 and 12, Figure V-1B1, B2, B3) increased throughout the experiment, while the biomass of the older leaf blade (leaf rank #8, Figure V-1B4) was maintained at around 1.5 g. However, in response to the LS-LN treatment, the biomass of expanding leaves was always lower than the control and the LS-HN plants. For example at day 28, the dry matter of LS-LN young leaves was about 7 fold lower than the control (Figure V-1B1).

#### III.2 Effects of limited sulphate supply on leaf senescence progression in the presence and absence of nitrate limitation

For each leaf rank, the expression of *SAG12* and *Cab* genes (up and down-regulated during the senescence process, respectively) was monitored by semi-quantitative RT-PCR (data not shown) in order to determine the theoretical date of the onset of foliar senescence (Gombert *et al.* 2006; Etienne *et al.* 2007; for details see Material and Methods section). For each treatment, the leaf senescence progression was determined by the derivative of the linear equation indicating leaf rank senescence as function of time (Figure V-2). In control plants,



**Figure V-2 :** Kinetics of the progression of leaf senescence along the axis of oilseed rape (A) in control plants (HS-HN), sulphate limited plants (LS-HN) and in combined sulphate and nitrate limited plants (LS-LN). For a given date, each value refers to the theoretical nodal position of the last leaf rank subjected to senescence (i.e. displaying SAG12 up-regulation and Cab down-regulation, concomitantly, in leaf blade). Other details as for Figure V-1. Photography of old leaf (leaf rank #8) in combined sulphate and nitrate limited plants (LS-LN), control plants (HS-HN), and sulphate limited plants (LS-HN) (B).

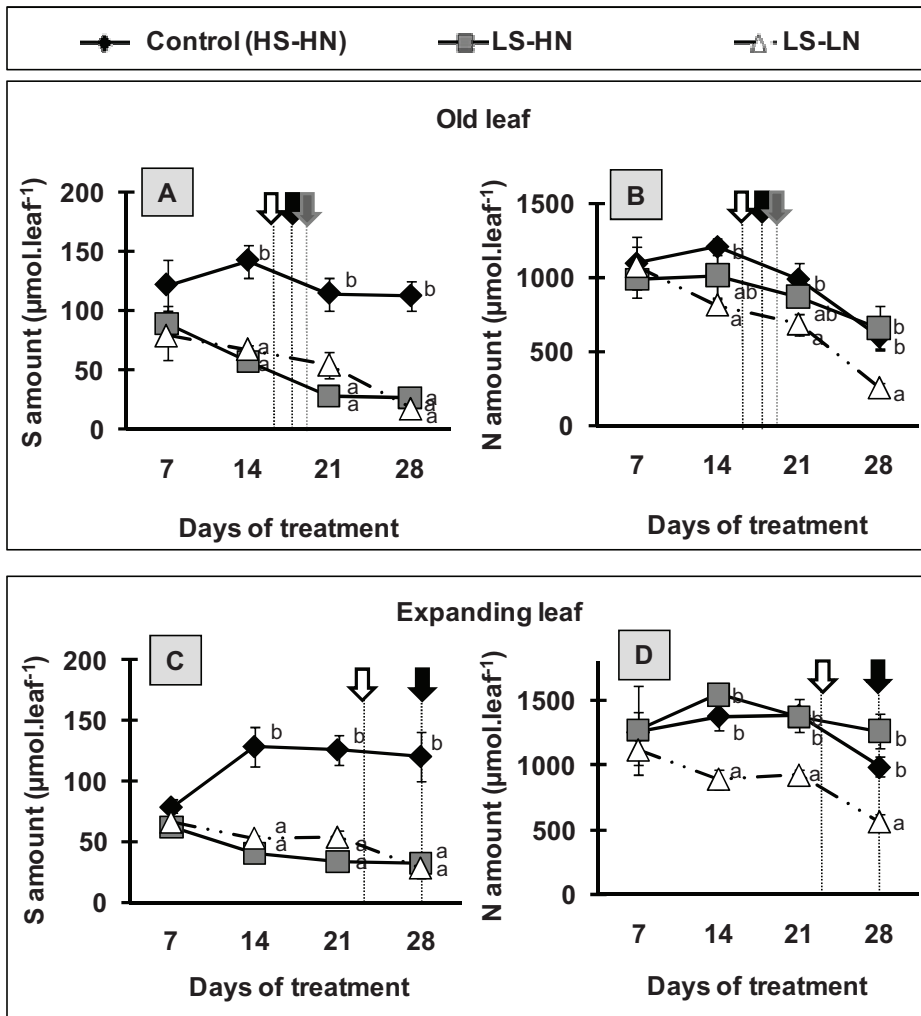


**Figure V-3 :** Changes in the chlorophyll (SPAD) of the leaf ranks #8 (A) and #10 (B) of oilseed rape in control plants (HS-HN), sulphate limited plants (LS-HN) and in combined sulphate and nitrate limited plants (LS-LN) for 28 days of treatments. Vertical arrows indicate the date of theoretical onset of leaf senescence as described in Materials and methods. HS-HN : black arrow, LS-HN : grey arrow, LS-LN : white arrow. Other details as for Figure V-1.

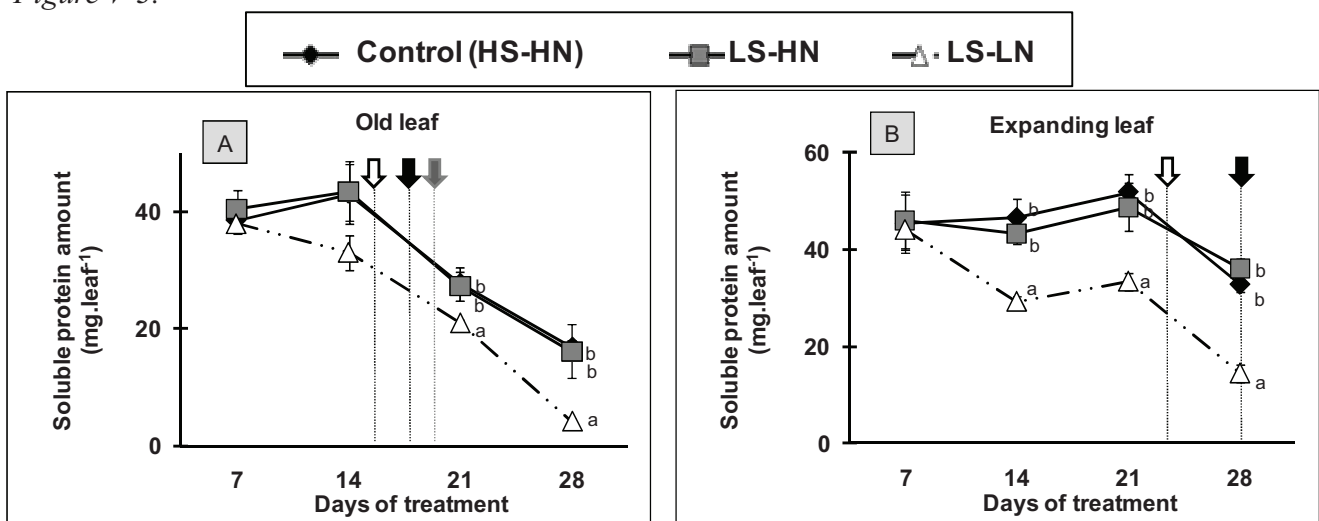
the senescence progressed by 0.19 leaf ranks per day throughout the experiment (Figure V-2). Between 0 and 14 days, the progression of leaf senescence in response to LS-HN and LS-LN treatment was not significantly different from the control (data not shown). In contrast, after day 14, sulphate limitation affected the progression of leaf senescence differentially according to nitrate availability (Figure V-2). Compared to the control, the progression of leaf senescence was 1.4 fold lower in LS-HN and 2.3 fold higher in LS-LN plants. Using the corresponding equation given in Figure V-2, it was possible to determine the theoretical date of the commencement of senescence for a given leaf rank in order to evaluate the impact of the treatment on leaf development. Thus, in the older leaves, such as leaf rank #8, which were likely to export S reserves during the experiment, the theoretical date of the commencement of senescence was determined at day 18, 19 and 16, for control, LS-HN and LS-LN plants, respectively (Figure V-2). In contrast, senescence in leaf rank #10, which was a young expanding leaf at the start of the treatment and became a fully expanded leaf by the end of the experiment, was determined at day 28 for control, day 34 for LS-HN, and day 23 for LS-LN plants (Figure V-2).

The effects of limited S supply applied with or without N limitation on senescence progression were confirmed by the changes of the chlorophyll concentrations (Figure V-3). In leaf blade of old leaf (rank #8) from control plants, the chlorophyll concentration decreased after 21 days to reach a minimum value of 18.3 SPAD units after 28 days (Figure V-3A). In LS-HN treatment, the chlorophyll concentration of old leaves was similar to the control. Compared to both other treatments, the chlorophyll concentration in the old leaves of LS-LN plants started to decrease between 14 and 21 days and was significantly affected by day 21. In the expanding leaf #10 from control plants (Figure V-3B), the chlorophyll concentration decreased after 21 days to reach a minimum value of 43 SPAD units after 28 days. During the experiment the changes of chlorophyll concentration in the expanding leaves of LS-LN plants were similar to the control. In the LS-HN treatment, the chlorophyll concentration of the expanding leaves was maintained at a value higher than 50 SPAD units throughout the experiment (Figure V-3B). The chlorophyll concentration in the expanding leaf of LS-LN plants was not affected before day 28, compared to the control, but was lower than for LS-HN plants.





**Figure V-4 :** Changes in the S and N amounts of the leaf blade of the leaf ranks #8 (A and B) and #10 (C and D) of oilseed rape in control plants (HS-HN), sulphate limited plants (LS-HN) and in combined sulphate and nitrate limited plants (LS-LN) for 28 days of treatments. Other details as for Figure V-3.



**Figure V-5 :** Changes in soluble protein amount in the leaf blade of the leaf ranks #8 (A) and #10 (B) of oilseed rape in control plants (HN-HS), sulphate limited plants (HN-LS) and in combined sulphate and nitrate limited plants (LN-LS) for 28 days of treatments. Other details as for Figure V-3.

### **III.3 Effects of limited sulphate supply on leaf N and S composition in old and expanding leaves in the presence and absence of nitrate limitation**

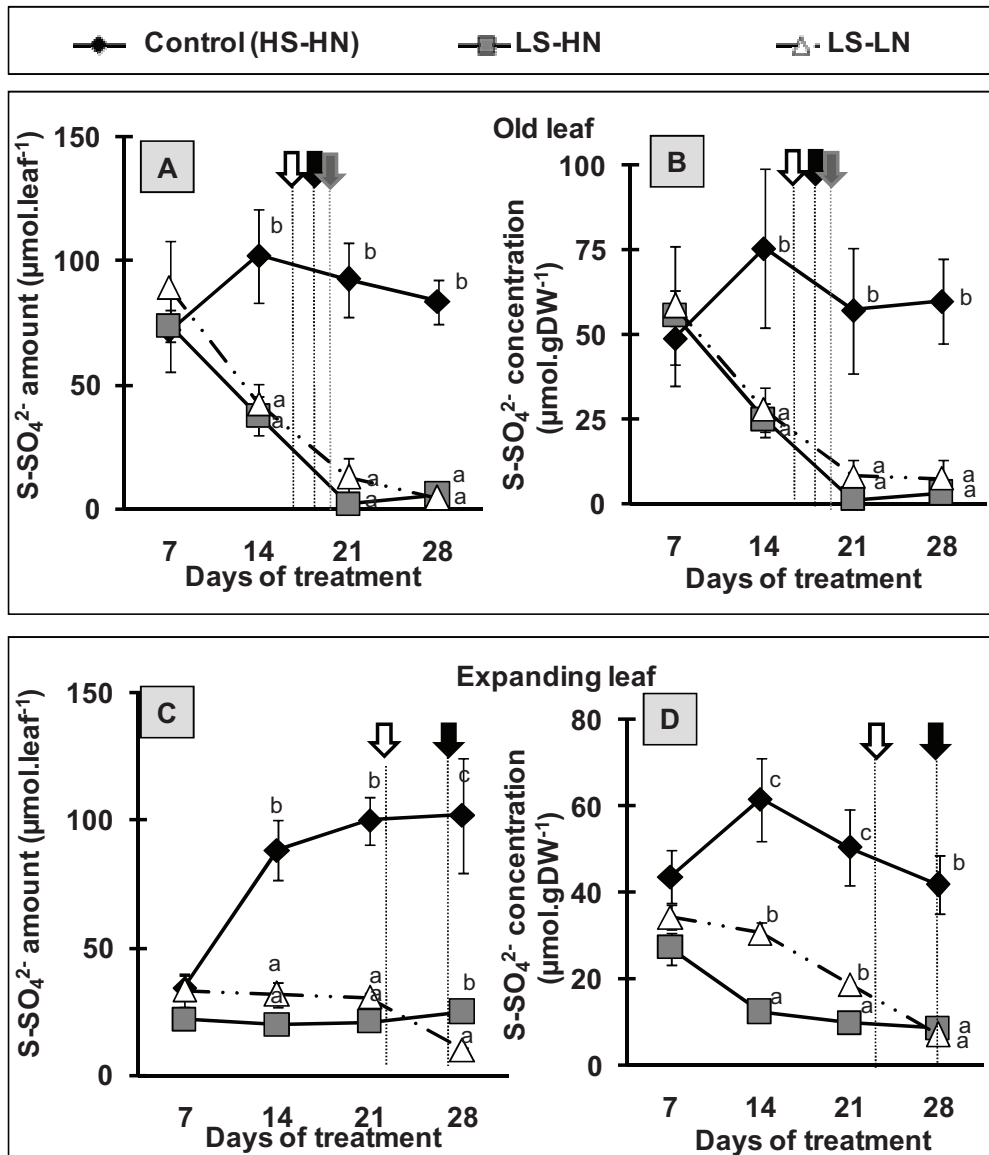
S and N dynamics were monitored to determine the efficiency of mobilization of these elements and corresponding compounds in leaf rank #10, corresponding to the expanding leaf, which was the most markedly affected in terms of progression of leaf senescence, and in leaf #8, which was an old leaf likely to mobilize its S compounds during the experiment (Figure V-4).

In the older leaf of the control, the S amount represented about 125  $\mu\text{mol}$  until day 28 (Figure V-4A). Compared with the control, the S amount decreased between days 7 and 21 in LS-HN and LS-LN. Finally, at day 28, the S amount represented only 24.2% of the control. In the expanding leaf of the control (Figure V-4C), the amount of S increased by about 40% between days 7 and 14 and remained stable thereafter. In response to the imposed limited S supply (LS-HN and LS-LN), the amount of S (Figure V-4C) decreased significantly after day 14, whatever the level of nitrate nutrition. Compared to the control, at day 14, the S amount was 70% and 60% lower in LS-HN and LS-LN, respectively.

In control plants, for 21 days, the N amount of old and expanding leaves was maintained at around 1 and 1.4  $\text{mmol}\cdot\text{leaf}^{-1}$ , respectively. After this time, the N amount in both leaves tended to slowly decrease. Compared with control, the N amount of the old and expanding leaves was not affected in LS-HN plants (Figure V-4B and D). In contrast, in the old leaf from LS-LN plants, the N amount decreased significantly after day 14. Finally, at day 28, the amount of N was 4-fold lower than at day 7 in LS-LN while it was only 2-fold less in control plants. Moreover, the amount of N of the expanding leaf from LS-LN plants decreased significantly after day 14, and reached a value two fold lower at day 28 compared to day 7.

### **III.4 Effects of limited sulphate supply on soluble proteins in old and expanding leaves in the presence and absence of nitrate limitation**

Proteins are known to be mobilized during the senescence process and are an important reserve of N and S. The dynamics of soluble protein amounts would be expected to agree with



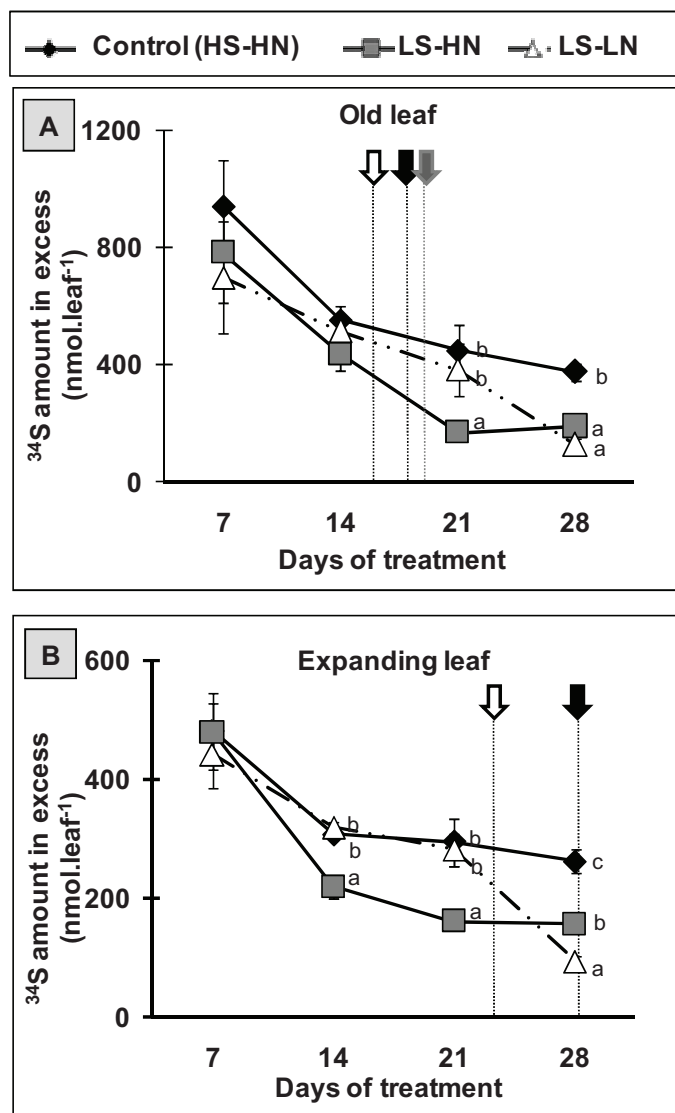
**Figure V-6 :** Changes in the sulphate-sulphur amount and concentration in the leaf blade of the leaf ranks #8 (A and B) and #10 (C and D) of oilseed rape in control plants (HS-HN), sulphate limited plants (LS-HN) and in combined sulphate and nitrate limited plants (LS-LN) for 28 days of treatments. Other details as for Figure V-3.

the molecular indicators of senescence *SAG12/Cab* (Figure V-2). The changes of soluble protein amount in the old and expanding leaves were similar in control and LS-HN (Figure V-5). In both treatments, the soluble protein amount decreased between day 14 and 28 (Figure V-5A), and day 21 and 28 (Figure V-5B) for old and expanding leaves, respectively. In LS-LN conditions, the soluble protein amount in the old leaf was significantly lower than in control up to day 21 and was finally 4-fold lower than the control by day 28 (Figure V-5A). In contrast, in response to LS-LN treatment, the soluble protein amount in the expanding leaf firstly decreased by 33 % between 7 and 14 days (Figure V-5B) and secondly after day 21 to finally represented at day 28 only 44.2% of the control.

### III.5 Effects of limited sulphate supply on sulphate and $^{34}\text{S}$ amounts in old and expanding leaves in the presence and absence of nitrate limitation

In the oldest leaves of control plants, the  $\text{SO}_4^{2-}$  amount increased between 7 and 14 days to reach a maximum around  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{leaf}^{-1} \text{ S-SO}_4^{2-}$ , and then remained constant between 14 and 28 days (Figure V-6A). The  $\text{SO}_4^{2-}$  amount of old leaves of LS-HN and LS-LN plants strongly decreased until day 21. Throughout the experiment, the  $\text{SO}_4^{2-}$  amounts and concentrations observed in the old leaves from LS-HN plants were not significantly different from the amounts observed in LS-LN plants (Figure V-6A and 6B).

In the expanding leaf of control plants, the  $\text{SO}_4^{2-}$  amount increased between 7 and 14 days to reach a maximum of around  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{leaf}^{-1} \text{ S-SO}_4^{2-}$ , and remained constant between 14 and 28 days (Figure V-6C). Compared to the control, the  $\text{SO}_4^{2-}$  amount of expanding leaves of LS-HN and LS-LN plants remained lower during the experiment (around  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{leaf}^{-1}$ ). Between 7 and 21 days, the  $\text{SO}_4^{2-}$  amount was not significantly different in the expanding leaves from LS-HN and LS-LN plants. In contrast, between 21 and 28 days,  $\text{SO}_4^{2-}$  decreased in LS-LN, and at day 28, the  $\text{SO}_4^{2-}$  amount was 2.5-fold lower in LS-LN than in LS-HN. Notably this decrease coincides with the theoretical date of the commencement of senescence, as previously determined (Figure V-2). The dynamics of  $\text{SO}_4^{2-}$  concentration in the expanding leaf in LS-HN and LS-LN plants were different (Figure V-6D). The  $\text{SO}_4^{2-}$  concentration in the expanding leaf of LS-HN plants decreased by 54% between days 7 and 14, whereas it did not



**Figure V-7 :** Changes in the  $^{34}\text{S}$  amount in the leaf blade of the leaf ranks #8 (A) and #10 (B) of oilseed rape in control plants (HS-HN), sulphate limited plants (LS-HN) and in combined nitrate and sulphate limited plants (LS-LN) for 28 days of treatments. The plants were submitted to a long period of  $^{34}\text{S}$ -sulphate labelling until day 0, the date of the beginning of the chase period. Other details as for Figure V-3.

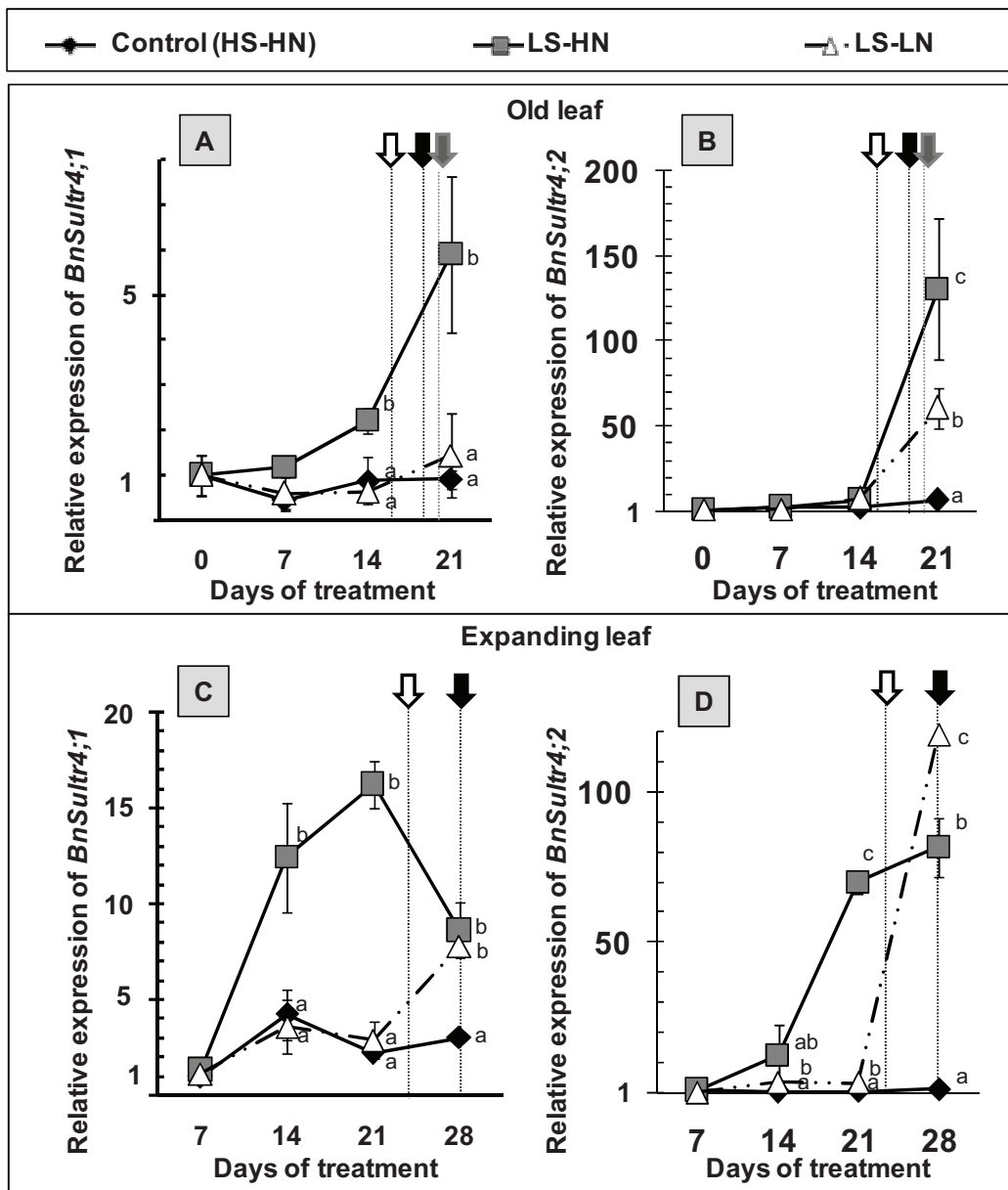
decrease in LS-LN plants. By day 28, there was no significant difference between the residual  $\text{SO}_4^{2-}$  concentration in the expanding leaves from LS-HN and LS-LN plants.

$^{34}\text{S}$  dynamics in old and expanding leaves were monitored to estimate the mobilization of S acquired before the application of S and N deficiencies (day 0). The  $^{34}\text{S}$  amount in the control old leaf decreased by 60% between 7 and 28 days of the treatment (Figure V-7A). In the LS-HN old leaves, limited sulphate supply provoked a faster mobilization of  $^{34}\text{S}$  (Figure V-7A). The  $^{34}\text{S}$  amount in the LS-LN expanding leaves declined similarly to the control expanding leaves until day 21, and decreased faster between 21 and 28 days to reach values similar to the LS-HN condition.

Figure V-7B shows that in spite of the increase followed by a maintenance of the total S amount at about  $125 \mu\text{mol}$  observed in the expanding leaves of the control (Figure V-4C), the  $^{34}\text{S}$  previously assimilated was mobilized. The  $^{34}\text{S}$  amount in the control expanding leaves decreased mainly between days 7 and 14 (by 38%) and remained constant thereafter. The change of  $^{34}\text{S}$  amount in the LS-HN expanding leaves was similar to the control up to day 14. Compared to the control, after day 7, the  $^{34}\text{S}$  amount of these leaves decreased rapidly before the theoretical date of the onset of senescence and represented at day 21, about a half of the  $^{34}\text{S}$  amount of control leaves (Figure V-7B). The  $^{34}\text{S}$  amount in the LS-LN expanding leaves was reduced substantially between days 21 and 28, to reach a value 80% lower than at day 7. It was observed that the high decrease of  $^{34}\text{S}$  between days 21 and 28, was concomitant to the theoretical date of onset of senescence previously determined for the LS-LN expanding leaves.

### **III.6 Effects of limited sulphate supply on *BnSultr4;1* and *BnSultr4;2* gene expression in old and expanding leaves and on *BnSultr1;1* and *BnSultr1;2* gene expression in roots in the presence and absence of nitrate limitation**

As the sulphate transporters *BnSULTR4;1* and *BnSULTR4;2* are implicated in the remobilization of sulphate stored in the vacuole (Buchner *et al.*, 2004; Kataoka *et al.*, 2004), their expression was examined in the old and expanding leaves (Figure V-8).



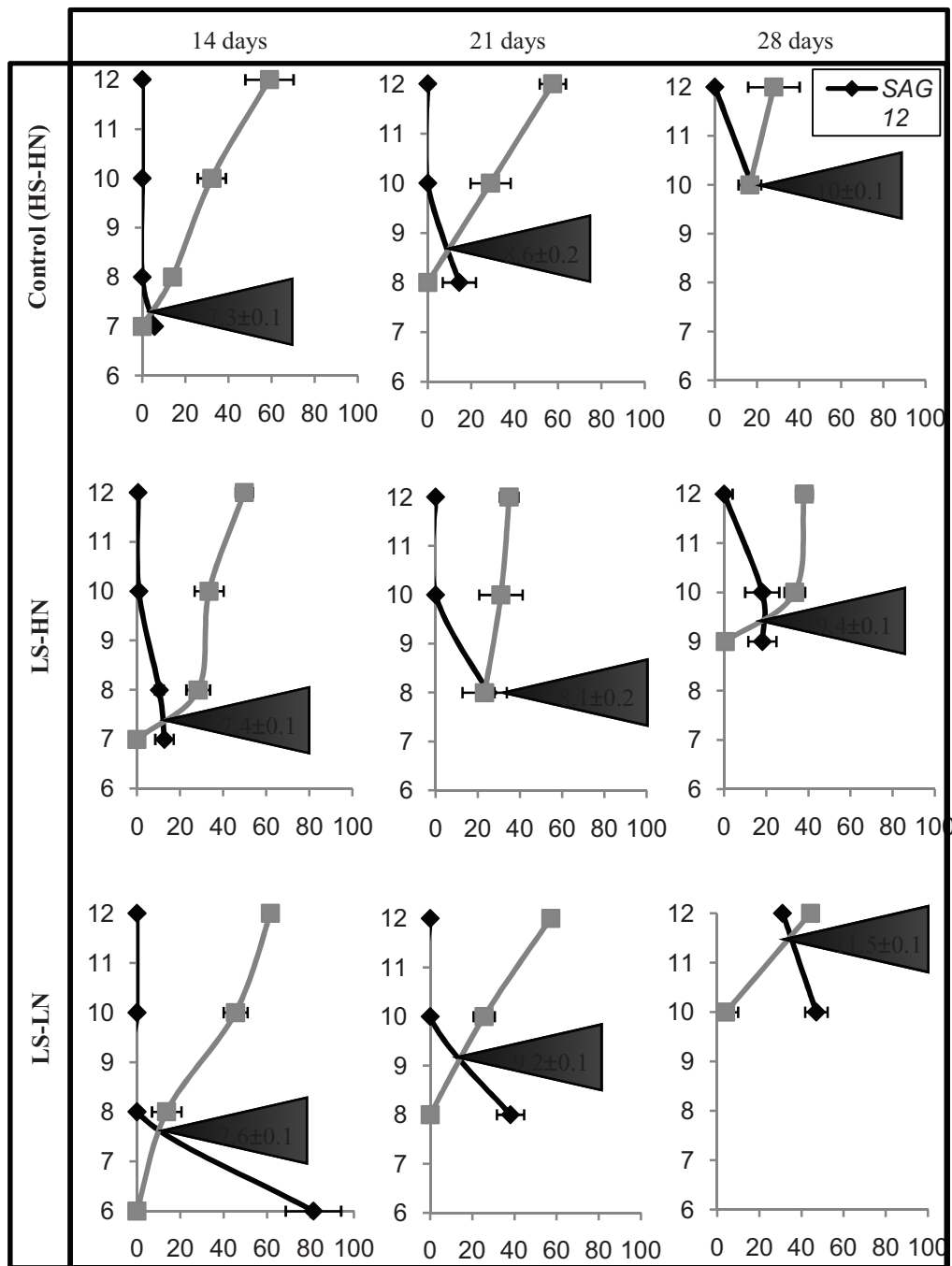
**Figure V-8 :** Relative expression of *BnSultr4;1* and *BnSultr4;2* genes expression in the leaf ranks #8 (A and B) and #10 (C and D) of oilseed rape in control plants (HS-HN), sulphate limited plants (LS-HN) and in combined nitrate and sulphate limited plants (LS-LN) for 28 days of treatments. The results of *BnSultr4;1* and *BnSultr4;2* expressions are relative to the result obtained in control plants (HS-HN) at day 7. Data were not determined at day 0 for the expanding leaf and at day 28 for the old leaf because of a lack of fresh matter. Other details as for Figure V-3.

In the older leaves of the control, *BnSultr4;1* gene expression was stable throughout the experiment (Figure V-8A) whereas *BnSultr4;2* gene expression was 6.7-fold increased between day 0 and 21 (Figure V-8B). In response to LS-HN treatment, *BnSultr4;1* expression in old leaves was higher than in control from day 14 until day 21 (with an expression 6.6-fold higher at day 21 than in control, Figure V-8A). *BnSultr4;2* expression also highly increased at day 21 in the LS-HN old leaf (19.6-fold higher than in control, Figure V-8B). For the old leaf in the double limitation (LS-LN), there was no significant difference for *BnSultr4;1* gene expression during the 21 days of experiment, while *BnSultr4;2* expression was 9.1-fold higher at day 21 (Figures V-8A and 8B).

In the expanding leaves of the control, *BnSultr4;1* gene expression was 4.3-fold increased between day 7 and 14 (Figure V-8C) while *BnSultr4;2* gene expression was stable throughout the experiment (Figure V-8D). In response to sulphate supply limitation (LS-HN), the level of *BnSultr4;1* gene expression was increased at day 14 (3.4-fold higher compared to the control) and remained highly expressed until the end of the experiment (Figure V-8C). In addition, *BnSultr4;2* gene expression also increased after day 21 in the expanding leaves subject to the LS-HN treatment and was 86.8-fold higher than control (Figure V-8D). In the case of the double limitation (LS-LN), there was no significant difference in *BnSultr4;1* gene expression compared to control expanding leaves before day 21 (Figure V-8C). Between 21 and 28 days, the expression level of *BnSultr4;1* was increased by 2.6-fold compared to the control expanding leaves. Compared to the control, *BnSultr4;2* gene expression in LS-LN increased slightly by day 14 (5.5-fold, Figure V-8D), and more strongly by day 28 (75.8-fold, Figure V-8D). Moreover, in response to the double limitation (LS-LN), the massive induction of *BnSultr4;1* and *4;2* genes in the expanding leaf coincided with the commencement of senescence as determined with the *SAG12/Cab* indicator (Figures V-8C and D).

Since it has been demonstrated that the two high-affinity sulfate transporters *Sultr1;1* and *Sultr1;2* were involved in the major part of sulphate uptake (Buchner *et al.*, 2004; Parmar *et al.*, 2007; Barberon *et al.*, 2008), and were dependent on different regulatory networks in *Arabidopsis* (Rouached *et al.*, 2008), the expression of these two genes was also examined in lateral roots (supplemental data #2). The *BnSultr1;1* and *BnSultr1;2* gene expressions in lateral roots (supplemental data #2) were up-regulated in response to S deficiency. Compared with control, *BnSultr1;1* expression was up-regulated at day 21 (9-fold) in LS-HN roots while it was not induced in LS-LN lateral roots. *BnSultr1;2* expression was also up-regulated at day 21 (3-fold) in LS-HN roots and at day 28 (3-fold) in LS-LN roots.





**Figure V-9 (Supplemental data #1):** Results of RT-PCR analysis of *SAG12* and *Cab* gene expressions in leaves from control (HS-HN), LS-HN and LS-LN plants of oilseed rape, expressed as a percentage of the maximum of both transcripts obtained in overall leaf rank studied. The intersection points, obtained at each date, are indicated by the grey arrows. They refer to the theoretical nodal position of the last leaf rank subjected to senescence (*i.e.* displaying *SAG12* up-regulation and *Cab* down-regulation, concomitantly, in leaf blade), used to determine the progression of senescence (see Figure V-2).

## IV. DISCUSSION

This study investigated the impact of limited S supply in the presence and absence of N limitation, applied to winter oilseed rape at the rosette stage, a vegetative stage of development often characterized by the occurrence of a transient limitation of mineral S and N resources. In order to determine if S recycling was associated with the foliar senescence processes, a leaf senescence molecular indicator (*SAG12/Cab*), previously developed by Gombert *et al.* (2006) and Etienne *et al.* (2007) in oilseed rape, was used. In addition, the dynamic of S remobilization in expanding and old leaves considered to export large amounts of S (Parmar *et al.*, 2007), was examined by using a long term steady-state method of  $^{34}\text{S}$  labelling and by studying the expression level of *BnSultr4;1*, and *BnSultr4;2* genes, which encode two transporters involved in efflux of sulphate from the vacuole (Kataoka *et al.*, 2004; Parmar *et al.*, 2007).

In the vegetative stage, the present study revealed that decreased sulphate supply (15  $\mu\text{M}$ ; LS vs 300  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4^{2-}$ ; HS) applied for 28 days had no significant effect on the total fresh matter of shoots (Figure V-1). These results are in accordance with the study conducted by Koralewska *et al.* (2007), indicating that biomass allocation in *Brassica oleracea* is not affected solely by low concentrations of sulphate in the root environment but only by actual deficiency. In our study, the period of pre-culture during 51 days with optimal sulphate level resulted in plants with a high initial S status. Thus, the remobilization of endogenous S compounds was sufficiently efficient to maintain the growth during the 28 days of S deficiency.

### IV.1 Is S remobilization in S limited plants related to leaf senescence processes and mineral N availability?

It is generally accepted that several resource limitations, such as water deficit or mineral N deficiency, can induce premature leaf senescence (Gan and Amasino, 1997; Smart, 1994; Etienne *et al.*, 2007; Diaz *et al.*, 2008). Based on the recent approach of Gombert *et al.* (2006)

and Etienne *et al.* (2007), the *SAG12/Cab* molecular indicator was used to determine the leaf senescence progression in oilseed rape. The effect of reducing sulphate supply on foliar senescence was highly dependent on nitrate availability. In the event of a transient mineral S deficiency occurring at the rosette stage, the recycling of endogenous foliar S compounds (particularly  $\text{SO}_4^{2-}$  which may account for up to 70 % of foliar S amount) may occur without any acceleration of leaf senescence process. Indeed, under high mineral N availability (LS-HN treatment), the spatial leaf senescence progression was not accelerated in response to reduced sulphate supply, but on the contrary, it was delayed until day 21 (Figure V-2). Moreover, these results were confirmed by the chlorophyll concentrations, which were maintained at a higher, or at least at the same level compared to the corresponding control leaves (Figure V-3). A similar result, with respect to chlorophyll concentration, was obtained by Blake-Kalff *et al.* (1998) for the oldest leaves of oilseed rape submitted to sulphate deficiency. According to Noodén *et al.* (1997), the establishment of senescence process in leaves is accompanied by an induction of proteolysis. The soluble protein amount in the old and expanding leaves of LS-HN plants remained similar to values of the control until the end of the experiment (Figure V-5). The remobilization of S from proteins does not take place under conditions of S starvation unless N is also deficient (Sunarpi and Anderson, 1996, 1997a, b). To our knowledge, it is the first time that a delay of leaf senescence in response to a sulphate deficiency has been demonstrated. In a recent experiment conducted with a different genotype of oilseed rape (Pollen), and for a longer period of S limitation which was applied 35 days earlier, a delay of the spatial leaf senescence progression was also observed (J-C Avice, unpublished). The delay of leaf senescence observed in oilseed rape due to sulphate deficiency may be explained by the modifications of S metabolism related to phytohormones involved in the regulation of leaf senescence process. Whilst about 20% of the methionine, synthesized simultaneously with cysteine (Ravanel *et al.*, 1998), is incorporated into proteins, 80% of the remaining methionine is converted to SAM (Giovannelli *et al.*, 1980; Giovannelli, 1990; Hoefgen and Hesse, 2007), a methyl donor required for the biosynthesis of ethylene, an up-regulator of leaf senescence (Sakai *et al.*, 1998). Thus, in this study, the effect of transient S deficiency on leaf senescence may be explained by a decrease of SAM and ethylene biosynthesis in response to limiting S-assimilation (Hesse *et al.*, 2004).

To assess whether mobilization processes were associated with the observed senescence, N and S composition and dynamics were studied in leaf #8 (an old and senescing leaf which can rapidly remobilize S) and leaf #10 (a leaf in expansion at the beginning of mineral S treatment

which became a mature leaf by the end of experiment). This expanding leaf is notable because it is the leaf rank subject to the most contrasting status of senescence in response to the treatments (Figure V-3).

## **IV.2 Dynamics of S remobilization and relationships between $\text{SO}_4^{2-}$ remobilization / *BnSultr4*-type gene expression in response to S deficiency is affected by N availability**

*SAG12/Cab* expression indicated that the old leaf of HS-HN (control) plants senesced 18 days after the beginning of the treatment (Figure V-2). As expected, after this date, decreases of chlorophyll concentration (Figure V-3A), total N (Figure V-4B) and soluble protein (Figure V-5A) amounts were observed. Surprisingly, the S (Figure V-4A) and  $\text{SO}_4^{2-}$  (Figure V-6A) amounts remained unchanged until the end of experiment, indicating that upon optimal S and N nutrition,  $\text{SO}_4^{2-}$  amount is maintained at high level in old leaves, independently of the senescence status. In addition, the expression of the *BnSultr4;1*, a gene encoding a transporter involved in the remobilization of the sulphate stored in the vacuolar compartment (Kataoka *et al.*, 2004; Parmar *et al.*, 2007), remained low in the control old leaves throughout the experiment (Figure V-8A). Nevertheless, the expression of *BnSultr4;2*, a gene encoding another putative tonoplast sulphate transporter (Kataoka *et al.*, 2004; Parmar *et al.*, 2007), increased during the experiment (x 6.7 by day 21, Figure V-8B) in old leaves of control plants. In parallel, a decrease of  $^{34}\text{S}$  amount had been observed since the beginning of the experiment (Figure V-7A), indicating that processes of remobilization in senescing leaves occurred even while continued new uptake of sulphate allowed the maintenance of the total S amount at a high level in these leaves. However, under optimal S availability, old leaves may be lost whilst still containing a high level of  $\text{SO}_4^{2-}$ , which must result in a low S use efficiency for oilseed rape.

In expanding leaves of control plants, the S amount strongly increased between day 7 and day 14 and remained stable at about 125  $\mu\text{mol}$  until the end of experiment (Figure V-4A). This may be explained by sulphate influx observed up until day 14 (Figure V-6). Nevertheless, while the S concentration of expanding leaves of control plants was not affected by senescence processes before the end of the experiment, the soluble protein amount (Figure

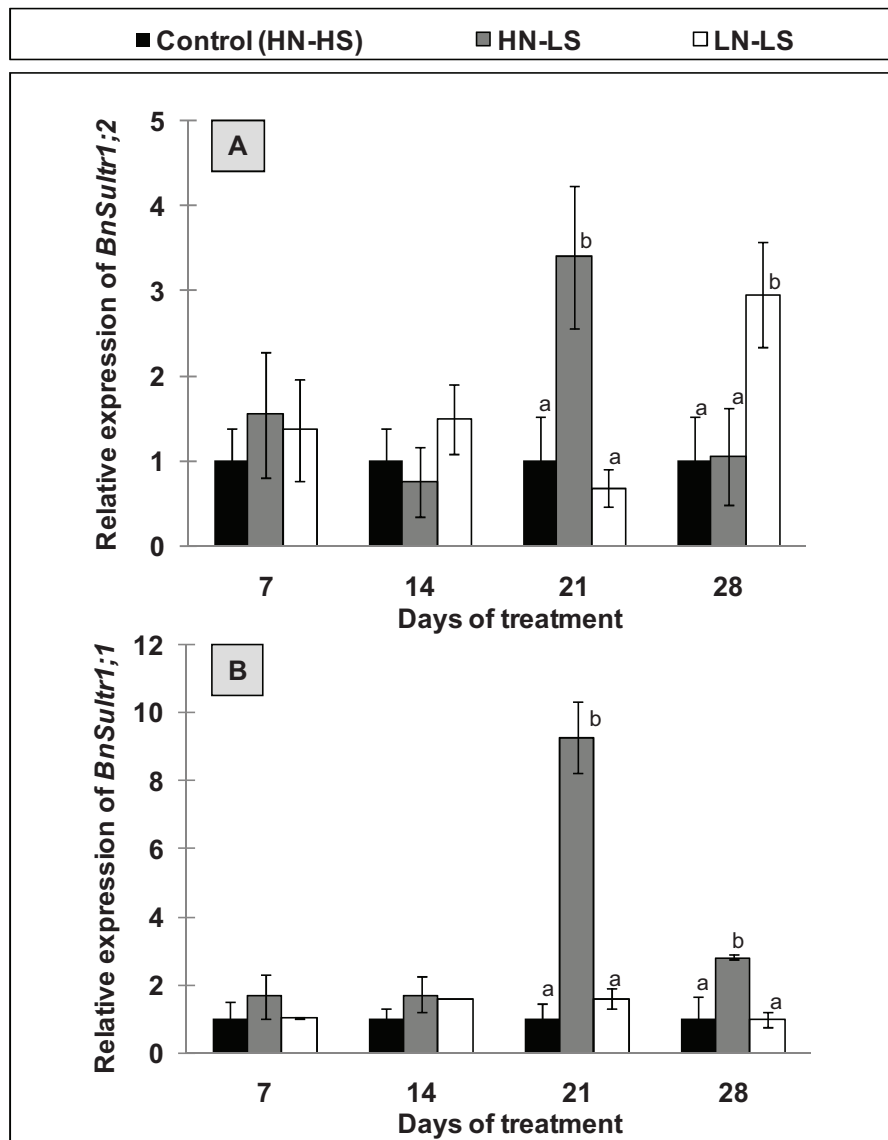
V-5, day 28) and the  $^{34}\text{S}$  previously incorporated significantly decreased (Figure V-7A). This decrease of  $^{34}\text{S}$  was in accordance with a transient increase of *BnSultr4;1* (but not *BnSultr4;2*) gene expression between 7 and 14 days (Figures V-8C and 8D). It is also interesting to note that in spite of a maintenance of the total S amount at about 125  $\mu\text{mol}$  (Figure V-4A), and of the  $\text{SO}_4^{2-}$  amount at about 100  $\mu\text{mol S-SO}_4^{2-}$  (Figure V-6A), the  $^{34}\text{S}$  previously incorporated in old leaves of the control decreased during the first 14 days of the experiment, mainly before the onset of senescence (Figure V-7A). These observations underline the complex foliar dynamics of S movements involving processes of mobilization independent of the senescence status and obscured under control conditions by an accumulation or maintenance of sulphate amount, which is principally in the vacuole. This mobilization of previously assimilated  $^{34}\text{S}$  can be explained by (i) a protein turnover accompanied by a mobilization of free S-amino acids generated by protein degradation, (ii) a mobilization of  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  concomitant to an accumulation of newly accumulated unlabelled  $\text{SO}_4^{2-}$ , and/or (iii) a mobilization of other organic S compounds such as glutathione, glucosinolates and non-protein thiols.

In response to limiting S supply (LS-HN), the total S amount of old leaves strongly decreased, indicating a large remobilization of S compounds. The decrease of S (Figure V-4A) is not related to the remobilization of S from proteins (Figure V-5A) but is mainly explained by the remobilization of previously accumulated sulphate (Figure V-6A), and coincided with the induction of *BnSultr4;1* gene expression. Compared to the control, *BnSultr4;1* gene expression was increased earlier than *BnSultr4;2* in old leaves of LS-HN plants (day 14 for *BnSultr4;1* compared to day 21 for *BnSultr4;2*, Figures V-8A and 8B). In addition, the kinetics of the  $^{34}\text{S}$  amount (Figure V-7A) paralleled the changes of sulphate amount and *BnSultr4;1* gene expression. As sulphate is often the major endogenous S compound (Blake-Kalff *et al.*, 1998), it may be hypothesized that the  $^{34}\text{S}$  mobilized in old leaves is in the sulphate form. Altogether, these data suggest that, under S limitation, the vacuolar transporters BnSULTR4 (initially mainly BnSULTR4;1 and under extreme conditions, BnSULTR4;2) contributed to the efficient efflux of sulphate from the vacuoles of old leaves, destined for redistribution towards young organs. Under these experimental conditions, this remobilization of sulphate in S limited plants was sufficient to maintain the growth of shoots at the same level as for control plants (Figure V-1A).

As with LS-HN plants, in response to combined limitations of S and N supply (LS-LN), the total S (Figure V-4A) and  $^{34}\text{S}$  (Figure V-7A) amounts of old leaves declined rapidly. The decrease of S in old leaves of LS-LN not only coincided with sulphate remobilization (Figure V-6A) but also with the recycling of S coming from the hydrolysis of soluble proteins (Figure V-5A) associated with the acceleration of senescence. The inhibition of shoot growth observed in LS-LN plants appears to be essentially due to the limitation of N nutrition. Compared to old leaves of LS-HN, the over-expression of the *BnSultr4;1* transporter gene was not observed in old leaves of LS-LN plants (Figure V-8A). In contrast, LS-LN conditions led to an increase *BnSultr4;2* expression at Day 21 (Figure V-8B), a pattern that coincided with the decrease of S and  $^{34}\text{S}$  amounts observed after this date (Figures V-4A and 7A).

Compared to the control, there is no accumulation of sulphate in the expanding leaves of LS-HN and LS-LN plants (Figure V-6C). Under LS-HN conditions, the transcripts abundance of *BnSultr4;1* and *BnSultr4;2* in expanding leaves strongly increased after 14 and 21 days, respectively, and remained high thereafter (Figure V-8C and Figure V-8D). Simultaneously, the  $\text{SO}_4^{2-}$  amount in expanding leaf of LS-HN plants remained low and stable (Figure V-6C), while the  $^{34}\text{S}$  amount decreased more rapidly than in control plants, before the theoretical date of the onset of senescence (Figure V-7B). These observations are explained at least partially by a mobilization of  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  concomitant with accumulation of newly acquired unlabelled  $\text{SO}_4^{2-}$  after day 0. In the LS-LN expanding leaf, the major decrease of  $\text{SO}_4^{2-}$  (Figure V-6C) and  $^{34}\text{S}$  (Figure V-7B) observed between 21 and 28 days was concomitant with the theoretical date of onset of senescence, as determined by the *SAG12/Cab* indicator, and to a significant increase of *BnSultr4;1* and *BnSultr4;2* expression (Figure V-8C and Figure V-8D). Therefore, in expanding leaves subject to S and N limitation, the tonoplast transporters, *BnSULTR4;1* and *BnSULTR4;2*, would be particularly involved in sulphate remobilization, concomitantly with the beginning of leaf senescence.

From these results, it appears that the sulphate mobilization observed in response to S limitation is more accurately determined by the  $^{34}\text{S}$  labelling-method than by the survey of apparent sulphate amounts. Second, in response to S limitation, the sulphate recycling is mainly related to the over-expression of tonoplast *SULTR4*-group transporters and the relationship between sulphate mobilization and up-regulation of the gene expression of these transporters seems to be dependant of leaf development, and more specifically on the availability of mineral N. This clearly confirms the interaction of N metabolism on S use



**Figure V-10 (Supplemental data #2):** Results of RT-PCR analysis of *BnSultr1;1* and *BnSultr1;2* gene expressions in lateral roots from control (HN-HS), HN-LS and LN-LS plants of oilseed rape. The results of expression are relative to the result obtained in control plants (HN-HS) at each date of harvest. Q-PCR amplifications were performed by using *BnSultr1;1* forward primer: 5'-AGATATTGCGATCGGACCAG-3' and reverse primer: 5'-GAAAACGCCAGCAAAGAAAG-3', and *BnSultr1;2* forward primer: 5'-GGTGTAGTCGCTGGAATGGT-3' and reverse primer: 5'-AACGGAGTGAGGAAGAGCAA-3'. As indicated for *BnSultr4;1* PCR analysis, *EF1-a* gene (Accession no: DQ312264), was used as an internal control gene. Details otherwise as for Figure V-3. As previously reported by Parmar *et al.* (2007), these data indicated that *BnSultr1;1* and *BnSultr1;2* gene expressions were significantly increased (since 21 days) in response to limitation of S supply (LS-HN).

efficiency as previously reported (Janzen and Bettany, 1984; Schnug *et al.*, 1993; Fismes *et al.*, 2000).

Interestingly, as with *BnSultr4;1* and *BnSultr4;2*, the expression of *BnSultr1;1* and *BnSultr1;2* genes in roots (supplemental data #2) was differentially regulated in response to sulphate limitation and depended on the nitrate availability. These results show that the observation for *BnSultr4;1* and *BnSultr4;2* in leaves might be a part of larger regulatory mechanism responsible for coordinated regulation of S and N metabolism between shoots and roots. The possibility for members of gene families of displaying an additional function besides its roles of sulphate membrane transport was recently raised by Barberon *et al.* (2008). Thus, in order to better understand the contribution of sulphate transporters of groups 1 and 4 in the S management between roots and shoots of oilseed rape subject to S limitation, it will be necessary to investigate the patterns of gene expression of these sulphate transporters and compare these data with the distribution of sulphate at whole plant level using  $^{34}\text{S}$  fluxes.

In conclusion, the processes involved in leaf S remobilization in response to restricted sulphate supply would differ in relation to nitrate availability. In the case of a transient mineral S limitation occurring at the rosette stage, the present study suggests that winter oilseed rape is able to maintain its growth by an optimization of the recycling of endogenous foliar S compounds (particularly sulphate) in old leaves without any acceleration of leaf senescence processes, which is not the case when S limitation is combined with low mineral N availability. Limitation of S supply induces a process of mobilization of sulphate concomitant with up-regulation of the BnSULTR4 transporters mediating vacuolar sulphate efflux (LS-HN treatment). In the future, to better characterize the processes of S recycling it will be interesting to compare foliar S distribution described here for oilseed rape rosettes with the distribution at stages characterized by higher growth rates and by high demand in S, for example during the bolting (stem elongation) and flowering stages.

**Acknowledgement:** This work was supported by the French National Research Agency (ANR-COSMOS n°ANR-05-JC05-51097). Rothamsted Research receives grant aided support from the Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC), UK. The



authors thank Mr Jean-Bernard Cliquet for his help in  $^{34}\text{S}$  oxidation, Mrs Servane Lemauviel-Lavenant for her help in statistical analysis, and Ms Alexandra Girondé for her valuable help in biochemical analysis.

# Chapitre VI

---

## Résultats

### Articles 3 et 4 :

**Hypothèse :** Les composantes de rendement et la part que représente la remobilisation des composés foliaires dans le remplissage des graines pourraient être modifiées par la période d'occurrence de la limitation en sulfate au cours du cycle de développement.

**Objectif :** L'objectif est de rechercher la période optimale de fertilisation en S en étudiant les composantes de rendements et les relations sources-puits vis-à-vis du S et du N en réponse à des niveaux contrastés de fertilisation en S appliqués aux stades de développement C2 (GS32) (= début de montaison c'est-à-dire début de développement de la tige), D2 (GS53) (= bourgeons floraux visibles) et G1 (GS70) (= début de remplissage des graines) du colza d'hiver.

**Méthodologie :** Les productions de biomasse et composantes de rendement (nombres de graines produites par plante, poids de 1000 graines, nombres de siliques, longueur des siliques, indices de récolte en S et en N, efficacité d'utilisation du S et du N) sont étudiées en réponse aux traitements. L'analyse de la composition des graines (teneurs en huile, protéines et glucosinolates des graines, composition lipidique des graines) a été menée en collaboration avec l'UMR118 INRA-Agrocampus Rennes-Université de Rennes1 (Nathalie Nesi, Véronique Gautier). Pour suivre les processus de remobilisation des composés soufrés et azotés, nous avons utilisé les traceurs isotopiques stables  $^{34}\text{S}$  et  $^{15}\text{N}$  avant une période de chasse associée à des niveaux de fertilisation en S contrastés appliqués en conditions contrôlées à différents stades de développement du colza jusqu'à obtention des graines.

**Résultats :** L'ensemble des résultats obtenus a démontré dans un premier temps (i) qu'en réponse à une limitation modérée du sulfate dans les sols, le colza peut optimiser la mobilisation de ses réserves en S endogène pour les graines (ii) que la disponibilité en S entre les stades de développement C2 (GS32) et D2 (GS53) est déterminante pour le processus de remplissage des graines et la qualité de l'huile produite (iii) qu'une restriction sévère à C2 (GS32) affecte les processus de remobilisation en S et en N.

Dans un second temps, une approche ciblée sur les processus de remobilisation inter-organes a révélé que l'efficacité de remobilisation du S (ERS) vers les graines était largement inférieure à celle du N en conditions non limitantes en S. En réponse à une limitation en S appliquée au stade G1 (GS70), près de 75% des besoins en S des graines peuvent être couverts par les feuilles.

Une des voies possibles d'optimisation de l'EUS chez le colza consisterait à augmenter la remobilisation foliaire des feuilles vers les graines (avec des teneurs résiduelles en S foliaire pouvant atteindre 0,1-0,2 % de la matière sèche)

## **CHAPITRE VI**

# **Etude de l'effet d'une limitation en S appliquée à différents stades de développement sur la mobilisation du S et N foliaire et ses conséquences sur les composantes du rendement**

---

### **Article 3 :**

**A- Effects of sulphate restrictions applied at different growth stages of winter oilseed rape on yield components and seed quality in relation with plant S and N partitioning.**

L. Dubousset<sup>1</sup>, V. Gautier<sup>2</sup>, N. Nesi<sup>2</sup>, P. Etienne<sup>1</sup>, J.C. Avice<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>*INRA, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N.C.S., Esplanade de la Paix, F-14032, Caen, France.*

<sup>2</sup>*UMR118 INRA-Agrocampus Rennes-Université de Rennes1, Amélioration des Plantes et Biotechnologies Végétales, F-35653, Le Rheu, France.*

**Key words:** oilseed rape, sulphate restriction, <sup>34</sup>S/<sup>15</sup>N labelling, harvest index, seed yield, seed quality.

## ABSTRACT

Our goals were to determine how sulphate limitation (LS) applied at different growth stages (GS) *i.e.* GS32 (bolting: LS32 treatment), GS53 (visible bud: LS53 treatment) for LS53, or GS70 (start of pod filling; LS70 treatment) impacted on seed yield and quality of oilseed rape. The contribution of S and N stored in vegetative tissues to seed filling was also investigated using long-term double  $^{34}\text{SO}_4^{2-}/^{15}\text{NO}_3^-$  labelling methods. LS32 conditions reduced the seed viability, the S and N amounts in seeds, and affected seed quality (glucosinolates, protein and oil contents, fatty acids composition). LS53 reduced the amount of S, glucosinolates and oil content in seeds while the N amount remained similar to the control. LS70 did not affect yield components. The  $^{34}\text{S}$  harvest index ( $^{34}\text{S}$  in mature seeds as % of total  $^{34}\text{S}$ ) was up to 70% in LS32, LS53 and LS70 *versus* 30.6% in control. The  $^{15}\text{N}$  harvest index was only reduced in LS32. Data indicate that oilseed rape can optimize the mobilization of S reserves from vegetative organs to seeds under moderate S limitation, and that the mineral S availability between GS32 and GS53 impacts on S and N remobilization processes and is a determinant for seed filling and quality.

## I. INTRODUCTION

Oilseed rape (*Brassica napus* L.) is a crop that produces seeds with high contents of oil and proteins for human and animal nutrition as well as non-edible uses. In modern-grown oilseed rape varieties (*i.e.*, double low varieties with zero erucic acid and a reduced content of seed glucosinolates), the S harvest index (S content in seeds divided by total S in the whole crop) is typically only 20% (McGrath and Zhao, 1996). This indicates that a large proportion of S taken up by the crop is retained in the vegetative tissues and pods.

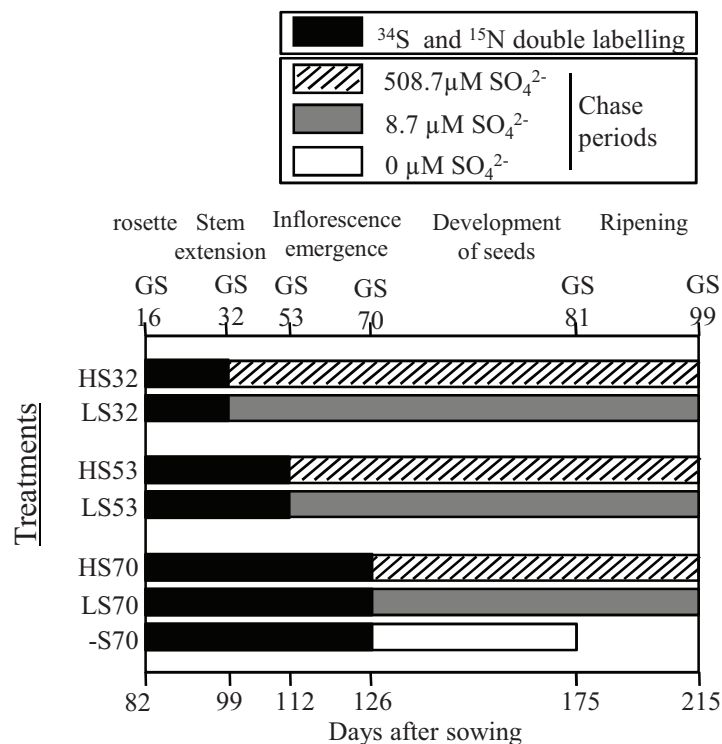
In order to increase crop competitiveness, the oil yield has to be improved while limiting fertilizer inputs. Compared with other crops such as cereals, oilseed rape is particularly sensitive to S deficiency because it has a high demand for S (Zhao *et al.*, 1997). The reduction in atmospheric deposition of S has increased the incidence of S deficiency in oilseed rape (McGrath and Zhao, 1996). S deprivation in oilseed rape leads to reduce seed yield and quality (Janzen and Bettany, 1984; Scherer, 2001). To provide an adequate amount of S, the recommendations of the French technical centre for oleaginous crops (CETIOM<sup>1</sup>) are about 30 kg S.ha<sup>-1</sup>. Oil, protein and glucosinolate concentrations in seeds have been shown to increase with S fertilization (Malhi *et al.*, 2007, Ahmad *et al.*, 2007). In addition, the application of S fertilizers also improves N-use efficiency and maintains a sufficient oil level and fatty acid quality (Fismes *et al.*, 2000).

In oilseed rape, S is mainly taken up by the roots as sulphate (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), transported *via* the xylem to the leaves, reduced to Cys, and either converted to Met or incorporated into proteins, Cys-containing peptides such as glutathione, or numerous secondary metabolites involved in plant defense (Sulphur-containing Defense Compounds, SDC). The root uptake and subsequent distribution of SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> to the leaves is closely related to growth demand and mineral S availability in soil. Sulphate stored into the vacuoles is the main form of S released by the mesophyll cells under low S nutrition conditions (Blake-Kalff *et al.*, 1998, Scherer, 2001, Matula & Pechová, 2002, Parmar *et al.*, 2007).

In oilseed rape, the rosette leaves play a crucial role for recycling foliar compounds to sustain seed filling during the reproductive stage and therefore contribute to the maintenance of seed yield. Noquet *et al.* (2004) have reported that ablation of 50% of the rosette leaves

---

<sup>1</sup> [www.cetiom.fr](http://www.cetiom.fr)



**Figure VI-A-1 :** Schematic diagram of experimental design. Mineral S restriction (Low S, LS) was applied at GS 32 (bolting stage) for LS32, GS 53 (visible bud stage) for LS53, or GS 70 (start of pod filling) for LS70, until the end of the growth cycle (GS99). A removal of sulphate (treatment – S70) was also experimented since GS 70 for a set of plants harvested at GS 81. From GS 16 to GS 32, GS 16 to GS 53 or GS 16 to GS 70), the plants were supplied with <sup>34</sup>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (1 atom% excess) and <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (2 atom% excess) in order to obtain plants with homogeneous <sup>34</sup>S and <sup>15</sup>N labelling before treatment applications. Control (High S, HS) corresponds to plants receiving adequate sulphate supply.

present at the bolting stage results in a 30% decrease in seed yield in oilseed rape. In the case of a transient mineral S limitation occurring at the rosette stage, winter oilseed rape is able to maintain its growth by optimization of the recycling of endogenous foliar S compounds (particularly sulphate) from old and mature leaves without any acceleration of leaf senescence processes (Dubousset *et al.*, 2009). Although mobilization of S from vegetative tissues is likely to be crucial for seed filling, very little is known about the dynamics, the efficiency and the contribution of S mobilization from vegetative tissues to seeds in oilseed rape.

In this study, we investigated the efficiency of S and N utilization in oilseed rape at the reproductive stage under S-sufficient (High S, HS) *versus* S-limited (Low S, LS) conditions. Keeping in mind the importance of S and N for seed yield and quality, the effects of S restrictions applied at different growth stages (GS) of winter oilseed rape (*cv* Capitol taken at GS 32, GS 53 or GS 70) were investigated on yield components as well as on the endogenous amounts of S and N in plants. To evaluate the level of S and N remobilisation from vegetative parts using stable isotopes as tracers, a greenhouse experiment was carried out for long-term steady state  $^{34}\text{S-SO}_4^{2-}$  and  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  pulse-labelling, applied at the beginning of stem elongation (GS 16) for different periods (17, 30 and 44 days), before applying S restriction. The dynamics of mobilisation of S compounds in response to different levels of S fertilization during the following chase periods were therefore estimated.

## II. MATERIALS AND METHODS

### II.1 Experimental treatments and Tissue sampling

For the greenhouse experiment, sterilized seeds were germinated in 20 L tanks on vermiculite to provide 24 seedlings per tank. Plants were firstly grown under a thermoperiod of 20°C (day-16h) and 15°C (night-8h), on 25% Hoagland nutrient solution (1.25 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1.25 mM  $\text{KNO}_3$ , 0.5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2 mM EDTA, 2NaFe $\cdot$ 3H $_2$ O, 14  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 5  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4$ , 3  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 0.7  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ , 0.7  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ , 0.1  $\text{CoCl}_2$ ) renewed twice a week for 36 days. The plants were then submitted to vernalisation at 8°C (day-10h) and 4°C (night-14h) for 46 days with the same nutrient solution renewed twice a week. After vernalisation, each plant was transferred to a pot containing a mixture of 1/3 vermiculite and 2/3 perlite and submitted to a thermoperiod of

20°C (day) and 15°C (night). As indicated in Figure VI-A-1, during different periods of growth (from GS 16 to GS 32, GS 53 or GS 70), plants were supplied with  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  (1 atom% excess) and  $^{15}\text{NO}_3^-$  (2 atom% excess) in order to obtain plants with homogeneous  $^{34}\text{S}$  and  $^{15}\text{N}$  labelling. Each day, the nutrient solution (25% Hoagland for HS control plants) was supplied automatically with the volume increasing as a function of the growth stages: 90 mL per plant at the start of bolting stage, 120 mL per plant at the bud stage, 150 mL per plant at the flowering stage, and 180 mL per plant at the seed maturation stage. Mineral S restriction corresponding to  $8.7 \mu\text{M SO}_4^{2-}$  was applied at GS 32 (bolting stage) for LS32, GS 53 (visible bud stage) for LS53, or GS 70 (start of pod filling) for LS70, until the end of the growth cycle (GS 99). To evaluate the potential use of atmospheric S by leaves in response to S deprivation, the removal of sulphate was also tested from GS 70 (for -S70) for plants harvested at GS 81.

The yield components (number of seeds, maximal length, number of pods per plant, and seed weight) were determined at harvest for eight replicates per treatment. The total number of mature seeds per plant was accurately determined at GS 99. At harvest, the different parts of plants (lateral roots, taproot, leaves, stem, floral stem, pod walls and seeds) were weighed, freeze-dried and ground to a fine powder for elemental and isotope analyses. The mature seeds were also used for the germination tests, as well as for analyses of oil and glucosinolate content and the determination of fatty acid composition.

## II.2 Measurements of real photosynthesis capacities

Measurements of photosynthesis were made between 9:00 AM and 12:00 PM using a portable photosynthesis measurement system (LI-6400, LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA). Each leaf was identified and numbered according to its date of appearance and nodal position (leaf rank number) with a labelled collar suspended on the petiole of each leaf rank after maturity. This allowed accurate identification of the leaves in expansion at the beginning of the LS32 (Leaf rank #9) and LS53 (Leaf rank #13) treatments as well as the fully expanded leaves at GS 76. Leaf ranks #9 and #13 were positioned at  $5.2 \pm 0.1$  cm and  $14.7 \pm 0.1$  cm above the crown and corresponded to the leaves that appeared a week before GS 32 and GS 53, respectively. The real photosynthesis capacity was deduced by subtraction between the net photosynthesis and the respiration rate measured in these leaves using the LI-6400 system at



20°C on leaves under their ambient CO<sub>2</sub> atmospheric concentrations (approximately 400 ppm). The photosynthetic photon flux (PPF) provided by a LED light was 0 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> for measurement of the respiration rate and was 1000 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> for photosynthesis, which is the optimal value of PPF validated for measurement of net photosynthesis in leaves of oilseed rape. In each treatment, the real photosynthetic rates were an average of four biological replicates.

### II.3 Determination of S and N amounts and analyses of <sup>34</sup>S and <sup>15</sup>N

Freeze-dried samples ground to fine powder were weighed and placed into tin analysis capsules. Both total S and N contents were determined with a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (Isoprime, GV Instruments, Manchester, UK) linked to an elemental analyser (EA3000, EuroVector, Milan, Italy). Stable isotope abundance (*A*) was calculated as follows:

$$A = 100 \times R_{\text{sample}} / (R_{\text{sample}} + 1)$$

where *R*<sub>sample</sub> corresponded to the isotopic ratio for N or S.

For each sample, the δ<sup>34</sup>S were collected and data were normalized using V-CDT (<sup>34</sup>S/<sup>32</sup>S ratio: 0.04415206), an internationally accepted isotope standard for S analysis.

$$R_{\text{sample}} = (\delta^{34}\text{S} \times 0.04415206 / 1000) + 0.04415206.$$

To determine the <sup>34</sup>S amount in excess, the natural vegetative isotope abundance of 4.2549% was subtracted to the value of *A* before multiplication by the DM of the considered tissue.

For each sample, the δ<sup>15</sup>N were collected and data were normalized using natural “Ratm N<sub>2</sub>” (corresponding to <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N ratio of atmosphere) as the isotope standard for N analysis.

$$R_{\text{sample}} = (\delta^{15}\text{N} \times \text{Ratm N}_2 / 1000) + \text{Ratm N}_2.$$

The natural vegetative <sup>15</sup>N abundance (0.3731%) of oilseed rape was used as a reference for <sup>15</sup>N analysis and determination of the <sup>15</sup>N amount in excess was calculated as indicated above for <sup>34</sup>S.

## II.4 Germination tests

Mature seeds obtained for each treatment were germinated on Whatman filter paper soaked with sterile water within petri dishes (12 × 12 cm). Fifty seeds per biological repetition ( $n=6$  for HS and  $n=4$  for each LS treatment) were sown on water for 7 days with a cycle of 8-h-dark (18°C) / 16-h-light (25°C). Three technical replicates were done for each biological repetition. The percentage of normal plantlets in formation indicated the number of viable seeds for each S-treatment.

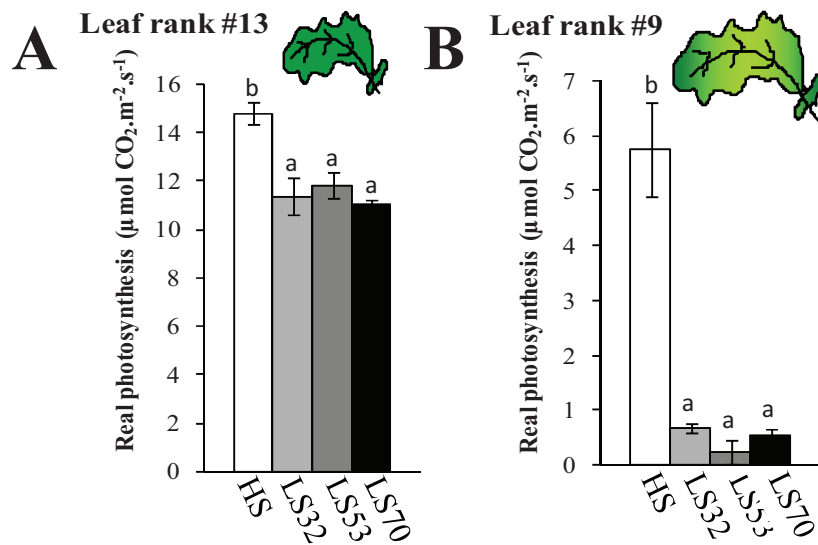
## II.5 Determination of oil and glucosinolate contents by NIRS

The seed samples were scanned on a monochromator NIRSystem model 6500 (FOSS NIRSystem Inc, Silver Spring, MD, USA) equipped with the transport module, in the reflectance mode. Intact seeds (about 5 g) were placed in a standard ring cup and scanned. The results were predicted from an external calibration established for oil and total glucosinolate content (CRAW, Gembloux, Belgium). Three determinations were performed for each sample. The results were given in % of oil per DM seed and in  $\mu\text{mol}$  of total glucosinolates per g of DM seed.

## II.6 Determination of oil content and lipids composition of seeds

The method for determination of seed oil content was based on direct methylation of fatty acids. Briefly, 10 mature dried seeds were ground in a microtube tube containing 3 inox balls using a Tissue Lyser system (Qiagen, Chatsworth, CA, USA). For each sample, three aliquots of 10 mg were weighed and transferred into glass tubes with Teflon-lined screw caps containing 1.32 mL of a freshly prepared solution of methanol/sulphuric acid/toluene (100/2.5/30, v/v/v) with 400  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of heptadecanoic acid as an internal standard. The mixture was shaken vigorously for 30 s and then heated at 95°C for 1 h. After cooling on ice

GS 76



**Figure VI-A-2 :** Real photosynthesis values at GS 76 in leaf ranks #9 and #13 of oilseed rape plants grown under HS, LS32, LS53, or LS70 conditions. Vertical bars indicate  $\pm$ SE of the mean ( $n=4$ ). Different letters indicate that mean values are significantly different ( $p<0.05$ ).

for 10-15 min, fatty acid methyl esters (FAMES) were extracted into 500  $\mu\text{L}$  of hexane following the addition of 1 mL of water. After vigorous hand shaking (15 s) and centrifugation (5 min, 2000 rpm), 10  $\mu\text{L}$  of the upper organic phase was analysed by gas chromatography (GC). If necessary, extracts were evaporated under nitrogen and dissolved into 50  $\mu\text{L}$  of hexane before GC analysis. FAMES were separated on a DB-WAX column (30 m l. x 0.25 mm i.d., 25  $\mu\text{m}$  film, J&W Scientific Columns from Agilent Technologies Co., Palo Alto, CA, USA) and quantified with a flame ionisation detector. The GC conditions were as follows: split mode injection (1:100), injector temperature at 250°C, oven temperature fixed at 220°C for 15 min and detector temperature at 260°C, with hydrogen as the carrier gas at a pressure of 100 kPa and a flow rate of 1 mL.min<sup>-1</sup>, in a 6890N GC GLC system (Agilent Technologies). To determine the mass of each fatty acid, the peak area was compared to the internal standard peak area. Results were given in  $\mu\text{g}$  of fatty acid per mg of DM seed.

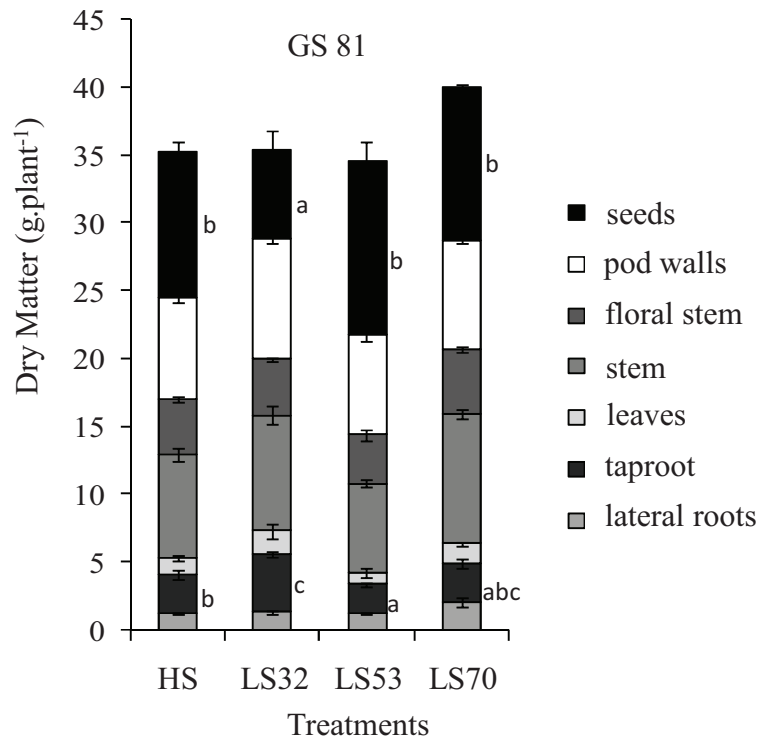
## II.7 Statistics

The normality of the data was studied with the Ryan-Joiner test at 95%. Analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test to compare the means were performed using MINITAB13 on *Windows* (Minitab Inc, State College, PA, USA). When the normality law of data was not respected, the non-parametric test of Kruskal-Wallis was carried out and followed by Mood's median test. Statistical significance was postulated at  $P < 0.05$ .

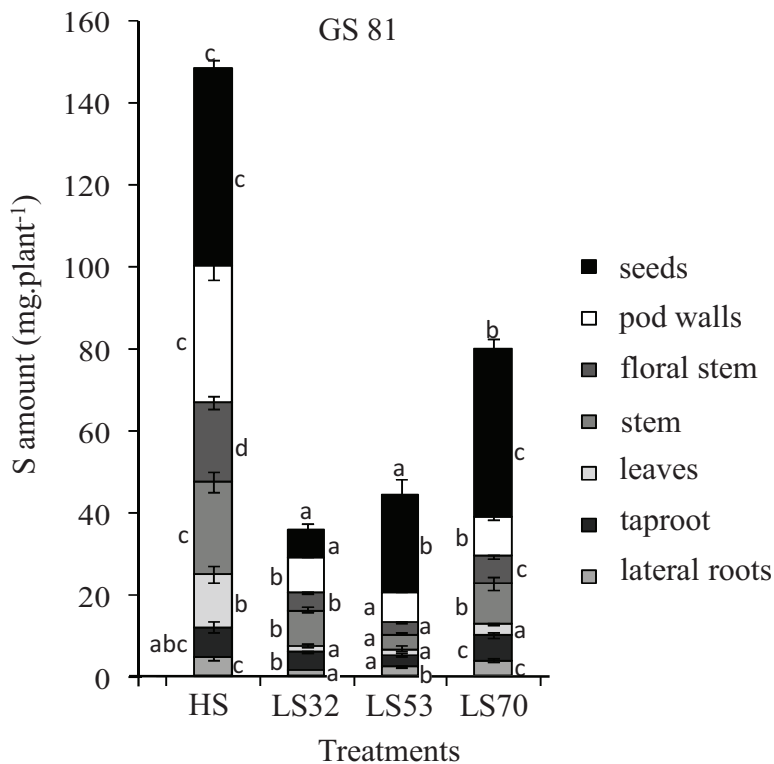
## III. RESULTS

### III.1 Effects of limited sulphate supplies on real photosynthesis capacities at GS 76

The photosynthesis capacity was measured in two leaf ranks (#9 and #13) corresponding to leaves fully expanded at GS 76 (when 60% of pods have reached their full length). These two leaf ranks were characterized by their dates of emergence: a week before GS 32 and GS 53 for leaf rank #9 and #13, respectively. Leaves no longer emerged at GS 70. In control (HS)



**Figure VI-A-3 :** Dry matter (DM) partitioning at GS 81 in plants grown under HS, LS32, LS53, or LS70 conditions. Vertical bars indicate  $\pm$ SE of the mean ( $n=12$  for HS,  $n=4$  for LS32, LS53, LS70). Different letters indicate that mean values are significantly ( $p<0.05$ ) different between treatments. The DM of the whole plants was not significantly different between treatments.



**Figure VI-A-4 :** S amount partitioning at GS 81 in plants grown under HS, LS32, LS53, or LS70 conditions. Vertical bars indicate  $\pm$ SE of the mean ( $n=12$  for HS,  $n=4$  for LS32, LS53, LS70). Different letters indicate that mean values are significantly ( $p<0.05$ ) different between treatments. Different letters above the histogram indicate plant S amounts significantly different while different letters nearby a portion of histogram correspond to different S amounts in the corresponding plant part.

conditions, the real photosynthesis capacity of leaf rank #9 was 2.7 fold lower than in the younger leaf rank #13 (Figure VI-A-2). Compared to the control, the photosynthesis capacity at GS 76 was significantly reduced in both leaf ranks under LS treatments, demonstrating that the real photosynthesis capacity decreased whatever the date of occurrence of S-limitation. However, this decline was much more important in leaf rank #9 ( $-92 \pm 2\%$  of the control) when compared with leaf rank #13 ( $-23 \pm 3\%$  of the control) (Figure VI-A-2).

### **III.2 Effects of sulphate availability on dry matter distribution in plants at GS 81**

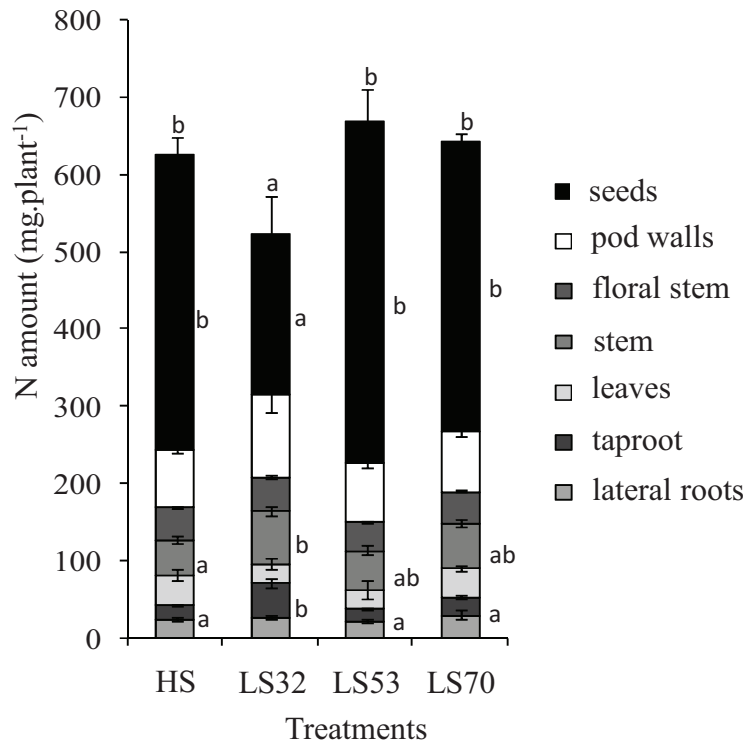
Whatever the mineral S treatment, the whole plant dry matter (DM) increased exponentially until GS 70 (data not shown) and was not significantly affected at GS 81 (when seeds turned to brown pigmentation) (Figure VI-A-3). However, the biomass partitioning differed from HS plants in response to the LS32 and LS53 treatments. Indeed, when compared to the control, plants under LS32 treatment displayed an increase of taproot DM from  $2.9 \pm 0.3$  g to  $4.3 \pm 0.2$  g. The seed DM was also reduced by almost 40% (from  $10.9 \pm 0.7$  g to  $6.5 \pm 1.4$  g per plant) while it was not significantly different in LS53 or LS70 than in HS. In contrast, taproot DM was significantly reduced in LS53 plants and represented  $2.1 \pm 0.1$  g per plant at GS 81 (Figure VI-A-3).

### **III.3 Effects of sulphate availability on S partitioning in plants at GS 81**

The S distribution in different parts of the plants observed at GS 81 in response to restrictions of mineral S availability applied at different growth stages is given in Figure VI-A-4. The total S amount in plants was drastically affected by the treatments and reached  $35.3 \pm 0.6$  mg,  $47.7 \pm 0.6$  mg, and  $79.0 \pm 3.6$  mg per plant under LS32, LS52, and LS70 conditions respectively whereas it attained  $147.1 \pm 5.9$  mg in HS plants at GS 81. In control plants, S was primarily found in seeds at GS 81, reaching  $32.4 \pm 1.6\%$  of the total S amount.

Compared with the control, sulphate restrictions strongly reduced the S amounts in vegetative parts, especially in leaves:  $2.0 \pm 0.3$  mg per plant (LS32, LS 53 and LS70) versus

GS 81



**Figure VI-A-5 :** N amount partitioning at GS 81 in plants grown under HS, LS32, LS53, or LS70 conditions. Vertical bars indicate  $\pm$ SE of the mean ( $n=12$  for HS,  $n=4$  for LS32, LS53, LS70). Different letters indicate that mean values are significantly ( $p<0.05$ ) different between treatments. Different letters above the histogram indicate plant N amounts significantly different while different letters nearby a portion of histogram correspond to different N amounts in the corresponding plant part.

**Table VI-A-1 :** Yield components at GS99 of plants grown under HS, LS32, LS53, or LS70 conditions. The values correspond to the mean  $\pm$ SE ( $n=24$  for HS,  $n=8$  for LS32, LS53, LS70). Different letters indicate that mean values are significantly different ( $p<0.05$ ).

	Maximal length of pods (cm)	Number of pods per plant	Thousand seed weight (mg)
<b>HS</b>	8.3 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	178 $\pm$ 4	4 694 $\pm$ 39.50 <sup>b</sup>
<b>LS32</b>	7.5 $\pm$ 0.8 <sup>ab</sup>	162 $\pm$ 6	3 124 $\pm$ 293.9 <sup>a</sup>
<b>LS53</b>	8.4 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	165 $\pm$ 9	4 928 $\pm$ 140.1 <sup>b</sup>
<b>LS70</b>	7.9 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	187 $\pm$ 7	4 583 $\pm$ 53.02 <sup>b</sup>

12.9 ±2 mg in control (Figure VI-A-4). In response to the LS32 treatment, seeds contained 18.4 ±4.1% of the total S amount while the S amount in stems and taproots corresponded to 24.4 ±2% and 12.1 ±0.5% of total S in plants, respectively (Figure VI-A-4). In plants subject to the LS53 treatment, 49.8 ±2.9% of the total S amount was present in seeds. Compared to control, the S amount in floral stems and pod walls of LS53 treatment was highly reduced and reached 2.9 ±0.2 mg and 7.4 ±0.2 mg respectively corresponding to 6.0 ±0.5% and 15.5 ±0.8 % of total S in plants (Figure VI-A-4). Under LS70 conditions, the S amount in seeds was similar to the control and corresponded to 51.5 ±0.8% of the total S amount in LS70 plants (Figure VI-A-4). In proportion to the total S, the S in pod walls was reduced to 12.0 ±0.7% in response to LS70 treatment, which corresponded to about half of the control levels. The S amount in roots of LS70 plants did not differ from the control (Figure VI-A-4).

### **III.4 Effects of sulphate availability on N partitioning in plants at GS 81**

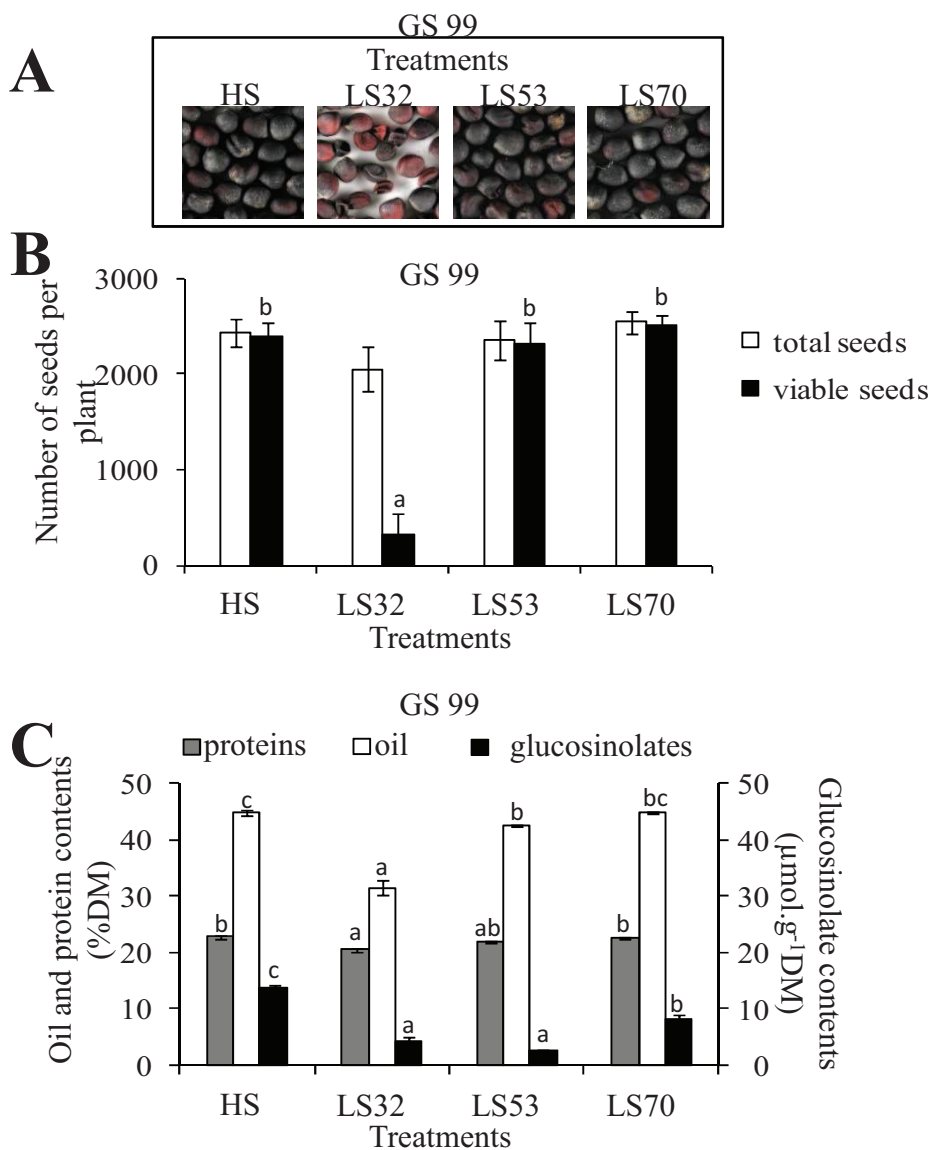
The major part of N in control plants was allocated to the seeds and it corresponded to 61.1 ±3.4 % of the total N. Compared with control plants, the total N amount and its partitioning were not significantly affected in LS53 and LS70 conditions at GS 81 (Figure VI-A-5). On the other hand, the LS32 treatment altered the total N amount and its partitioning. In seeds, the N amount underwent a 2-fold decrease as compared to the control. In contrast, the N amount in stems and taproots of LS32 plants increased in comparison with the control (Figure VI-A-5).

### **III.5 Effects of sulphate availability on yield components and seed quality at GS 99**

#### ***Yield components***

The maximal length of pods was around 8.3 cm in Capitol and was significantly reduced by 0.4 ±0.1 cm in LS70 conditions (Table VI-A-1). The number of pods per plant was around 178 in control plants and was not affected by the S restriction treatments (Table VI-A-1). The thousand seed weight reached 4694 ±39.50 mg in the control and was not modified by LS53





**Figure VI-A-6 :** Pictures of seeds (A), number of total seeds and viable seeds per plant (B) and seed composition evaluated by NIRS in total seeds (C) harvested at GS 99 on plants grown under HS, LS32, LS53, or LS70 conditions. Vertical bars indicate  $\pm$ SE of the mean (in B, the number of total seeds per plant was determined with  $n=24$  for HS,  $n=8$  for LS32, LS53, LS70 ; in C  $n=6$  for HS,  $n=4$  for LS32, LS53, LS70 with three technical repetitions for each analysis). Different letters indicate that mean values are significantly ( $p<0.05$ ) different between treatments.

and LS70 treatments while it was significantly reduced by the LS32 treatment (with  $3124 \pm 293.9$  mg) (Table VI-A-1).

### ***Seed phenotype and viability***

In response to the LS32 treatment, seed morphology and pigmentation were affected (Figure VI-A-6A). The weak filling of the seeds (considering the reduced weight and the germination tests) and the altered seed coat pigmentation phenotype revealed that a large proportion of the seeds produced in LS32 conditions were not well matured. The number of viable seeds produced in LS32 conditions significantly decreased and corresponded to  $15.3 \pm 1.6\%$  of total seeds (Figure VI-A-6B).

### ***Content of glucosinolates, proteins and oil in seeds***

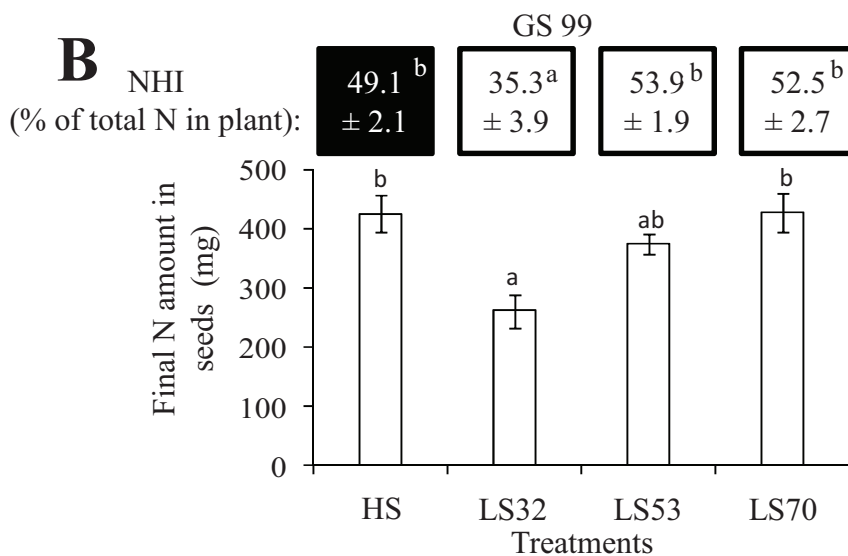
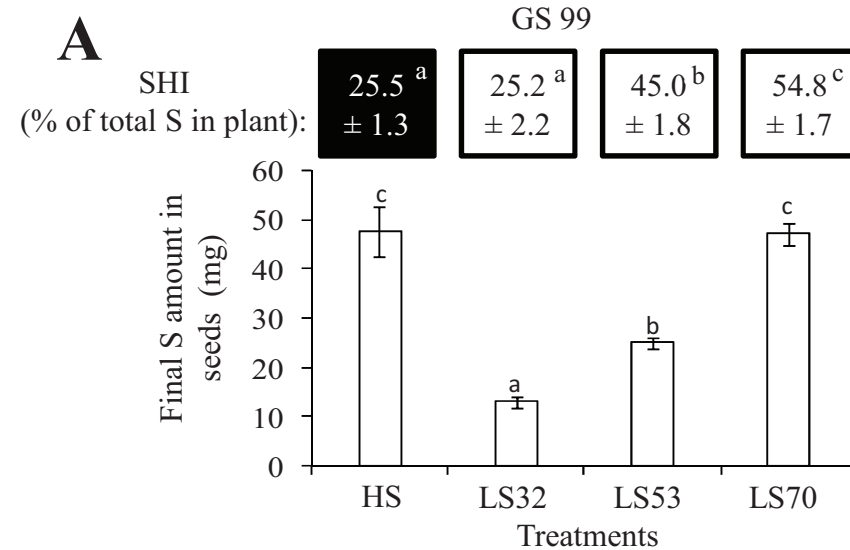
The seed composition measured at GS 99 displayed modifications for the three LS treatments. The main change observed in response to S restrictions was a strong decrease of glucosinolate content especially in LS32 and LS53 conditions (Figure VI-A-6C). It was reduced from  $13.71 \pm 0.43 \mu\text{mol.g}^{-1}$  DM in control to  $4.20 \pm 0.92$  and  $2.47 \pm 0.43 \mu\text{mol.g}^{-1}$  DM in LS32 and LS53 conditions, respectively (Figure VI-A-6C). The protein content reached  $22.8 \pm 0.3\%$ DM in control seeds and was not affected by the LS53 and LS70 treatments. In contrast, it showed a slight but significant reduction down to  $20.5 \pm 0.3\%$ DM in LS32 conditions (Figure VI-A-6C). The oil content in seeds represented  $44.7 \pm 0.48\%$ DM in control conditions and was not significantly modified by the LS70 treatment (Figure VI-A-6C). On the other hand, it was significantly decreased in LS32 and LS53 conditions and reached  $31.5 \pm 1.29\%$ DM and  $42.5 \pm 0.26\%$ DM, respectively.

### ***Fatty acid composition in seeds***

The decline in oil content observed for LS32 and LS53 conditions (Figure VI-A-6C) are consistent with the significant reduction in total fatty acid content (Table VI-A-2). The nutritional value and usefulness of vegetable oils depend on their respective fatty acid balance. Whatever S fertilization treatment was applied (Table VI-A-2), the main fatty acid produced in oil was oleic acid (C18:1). The LS70 treatment had no effect on fatty acid

**Table VI-A-2 :** Fatty acid composition in viable seeds harvested at GS 99 from plants grown under HS, LS32, LS53, or LS70 conditions. The values correspond to the mean  $\pm$ SE ( $n=6$  for HS,  $n=4$  for LS32, LS53, LS70). Different letters indicate that mean values are significantly different ( $p<0.05$ ).

GS99		Fatty acid composition ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{DM}$ )									
	Total fatty acids	C16:0 palmitic	C16:1 palmitoleic	C18:0 stearic	C18:1 oleic	C18:2 ( $\omega$ 6) linoleic	C18:3 ( $\omega$ 3) linolenic	C20:0 eicosanoic	C20:1 gadoleic	C22:0 behenic	C22:1 erucic
HS	434.7 $\pm 6.2^c$	18.3 $\pm 0.2^{ab}$	1.2 $\pm 0.0^a$	7.8 $\pm 0.2^b$	264.3 $\pm 4.1^b$	87.3 $\pm 1.4^c$	46.4 $\pm 1.1^c$	2.6 $\pm 0.1$	5.3 $\pm 0.1^b$	1.4 $\pm 0.0^a$	0.0 $\pm 0.0$
LS32	299.6 $\pm 5.4^a$	19.4 $\pm 0.4^b$	1.5 $\pm 0.0^b$	6.6 $\pm 0.3^a$	178.5 $\pm 4.3^a$	57.3 $\pm 1.2^a$	28.3 $\pm 0.8^a$	2.6 $\pm 0.0$	3.8 $\pm 0.1^a$	1.6 $\pm 0.0^b$	0.0 $\pm 0.0$
LS53	413.4 $\pm 3.5^b$	18.7 $\pm 0.2^{ab}$	1.2 $\pm 0.0^a$	7.2 $\pm 0.1^a$	256.7 $\pm 1.9^b$	79.1 $\pm 1.1^b$	41.1 $\pm 0.8^b$	2.6 $\pm 0.0$	5.3 $\pm 0.1^b$	1.6 $\pm 0.0^b$	0.0 $\pm 0.0$
LS70	433.0 $\pm 6.7^c$	18.2 $\pm 0.3^a$	1.2 $\pm 0.0^a$	7.9 $\pm 0.1^b$	266.2 $\pm 4.8^b$	85.6 $\pm 1.3^c$	44.3 $\pm 0.8^c$	2.7 $\pm 0.1$	5.4 $\pm 0.1^b$	1.5 $\pm 0.0^{ab}$	0.0 $\pm 0.0$



**Figure VI-A-7 :** Final S amount and S harvest index (SHI) (A), and final N amount and N harvest index (NHI) (B) in mature seeds harvested at GS 99 on plants grown under HS, LS32, LS53, or LS70 conditions. Vertical bars indicate  $\pm$ SE of the mean ( $n=12$  for HS,  $n=4$  for LS32, LS53, LS70). Different letters indicate that mean values are significantly different ( $p<0.05$ ) between treatments.

composition in mature seeds (Table VI-A-2). On the other hand, the LS32 treatment led to a significant reduction of all the C18 derivatives (Table VI-A-2). For instance, the quantity of C18:1 in LS32 seeds decreased by  $32 \pm 2\%$  compared to the control. In contrast, quantities in eicosanoic acid (C20:0), palmitoleic acid (C16:1) and behenic acid (C22:0) increased noticeably in response to LS32 treatment (Table VI-A-2). While the behenic acid concentration slightly increased in response to the LS53 treatment, the concentration of stearic, linoleic and linolenic acids were significantly reduced in comparison to control but to a lesser extent than in LS32 conditions (Table VI-A-2).

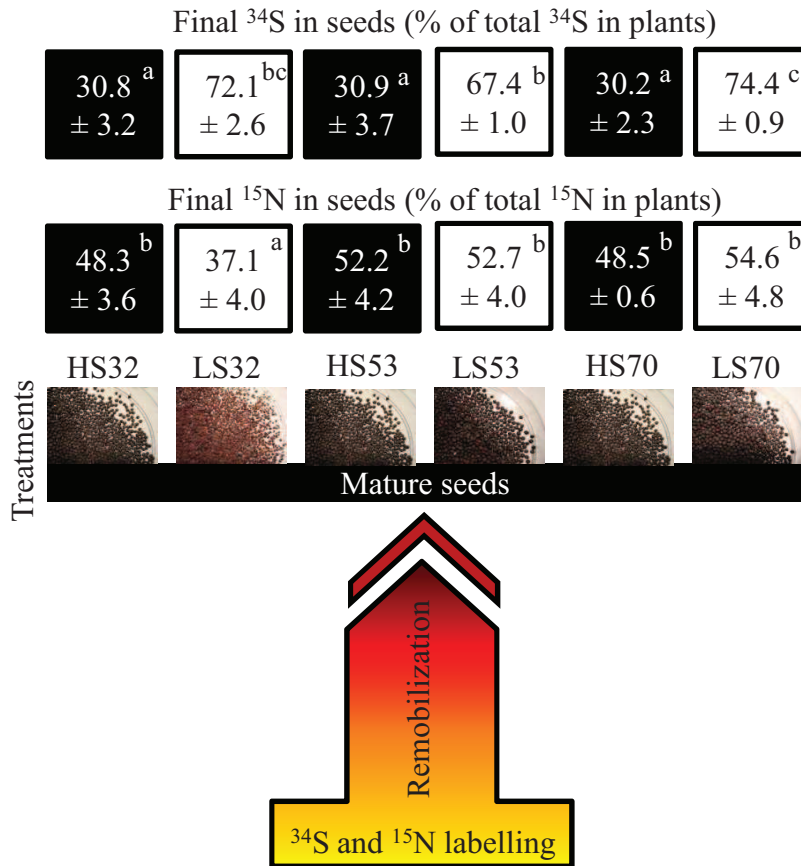
### **III.6 Effects of sulphate availability on final S and N amounts in mature seeds at GS 99**

The S amount in all seeds ( $47.7 \pm 5$  mg) in the control was unchanged between GS 81 and GS 99 (Figures VI-A-4 and 7A). In agreement with the S partitioning observed at GS 81, the S amount allocated to seeds at GS 99 was reduced by the LS32 and LS52 treatments and represented  $13.0 \pm 1.2$  mg and  $25.0 \pm 1.1$  mg respectively (Figure VI-A-7A). Interestingly, when expressed as the S Harvest Index (SHI = S amount in seeds expressed as % of total S amount in plant at GS 99), the proportion of seed S amount in plants was of  $25.5 \pm 1.3\%$  of total S in control plants and was similar in LS32 conditions, whereas it reached  $45 \pm 1.8\%$  and  $54.8 \pm 1.7\%$  in LS53 and LS70 conditions, respectively (Figure VI-A-7A).

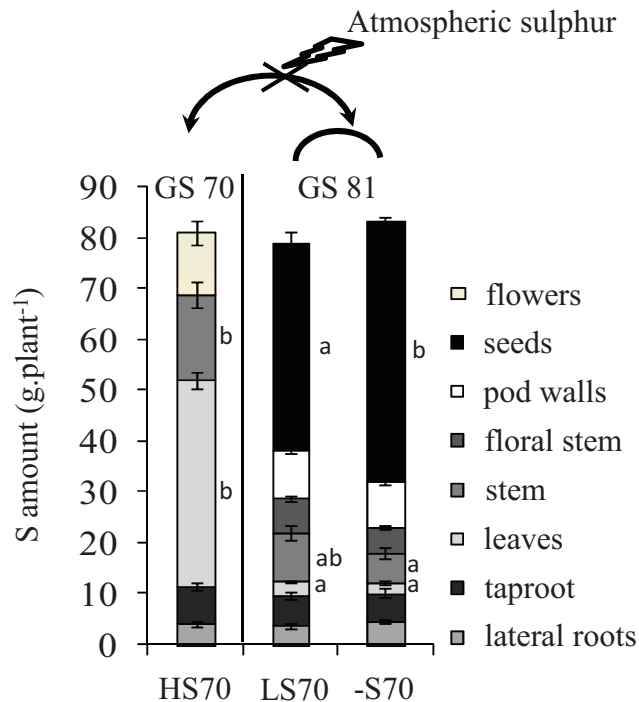
As observed at GS 81 (Figure VI-A-5), the N amount in mature seeds at GS 99 significantly decreased in LS32 conditions compared to control (Figure VI-A-7B). The relative N Harvest Index (NHI = N amount in seeds expressed as % of total N amount in plant at GS 99) was  $35.3 \pm 3.9\%$  in LS32 conditions whereas it reached  $49.1 \pm 2.1\%$  in control (Figure VI-A-7B). The other LS treatments did not affect the seed N amount or NHI in comparison with control.

### **III.7 Effects of sulphate availability on final $^{34}\text{S}$ and $^{15}\text{N}$ harvest index in mature seeds at GS 99**

GS 99



**Figure VI-A-8 :** Final  $^{34}\text{S}$  and  $^{15}\text{N}$  harvest index (percentage of  $^{34}\text{S}$  or  $^{15}\text{N}$  in seeds relative to total  $^{34}\text{S}$  or  $^{15}\text{N}$  present in the whole plant at the beginning of S-restriction treatment) in plants grown under HS32, HS53, HS70, LS32, LS53, or LS70 conditions. Different letters indicate that mean values ( $\pm\text{SE}$ ,  $n=4$ ) are significantly ( $p<0.05$ ) different between treatments.



**Figure VI-A-9 :** S amount partitioning at GS 70 under HS conditions and at GS 81 under LS70 or -S70 conditions. Vertical bars indicate  $\pm\text{SE}$  of the mean ( $n=12$  for HS,  $n=4$  for LS70 and -S70). Different letters indicate that mean values are significantly ( $p<0.05$ ) different between treatments.

The  $^{34}\text{S}$  or  $^{15}\text{N}$  amounts in mature seeds were used to calculate the harvest index for each tracer (expressed as % of total  $^{34}\text{S}$  or  $^{15}\text{N}$  present in whole plants at the beginning of S-restriction treatment). The  $^{34}\text{S}$  or  $^{15}\text{N}$  harvest indices illustrate the mobilization of S and N acquired after vernalisation and before the S treatments applied during the chase periods.

Independent of the end of labelling date (HS32, HS53 or HS70), the  $^{34}\text{S}$  harvest index was about 30.6% of the total  $^{34}\text{S}$  in plants in all HS plants (Figure VI-A-8). In response to the restriction in sulphate applied at GS 32 (LS32), the  $^{34}\text{S}$  harvest index reached  $72.1 \pm 2.6\%$  and was similar to the value obtained in LS53 conditions. A higher  $^{34}\text{S}$  harvest index ( $74.4 \pm 0.9\%$ ) was obtained in LS70 conditions, a value that was significantly different from LS53.

Irrespective of the end labelling date (HS32, HS53 or HS70), the  $^{15}\text{N}$  harvest index in control plants was quite similar and reached in average 49.7% of the total  $^{15}\text{N}$  (Figure VI-A-8). Whereas this value was unchanged in response to LS52 and LS70 treatments, it was reduced to  $37.1 \pm 4.0\%$  in LS32.

### **III.8 Effect of a deprivation in sulphate applied at GS 70 (-S70) on S amount and partitioning in plants**

At GS 70, leaves represented the major source of S for pod filling in control plants (representing about half of the total S amount) (Figure VI-A-9). To evaluate a hypothetical compensation of soil S limitation by a foliar S acquirement, the dynamics of the total S amount was monitored between GS 70 under HS conditions, and GS 81 under LS70 or -S70 conditions. Globally, the total S amounts in plants were similar between GS 70 and GS 81, which suggested an absence of (i) a significant S root uptake in LS70 conditions and of (ii) a potential compensation of soil S limitation by a foliar S acquirement. The S partitioning was different between the S restriction treatments and the S in seeds was higher in -S70 than in LS70 (representing about a half of the total S amount) (Figure VI-A-9). The S amount in roots was unchanged between GS 70 and GS 81.

## **IV. DISCUSSION**

In this study, the impacts of S-sufficient (High S, HS) *versus* S-limited (Low S, LS) conditions applied at key stages of the ontogenetic cycle (bolting stage, GS 32; visible bud,

GS 53; onset of pod filling, GS 70) were investigated on the seed yield components and grain quality traits. To determine the contribution of S and N reserves to seed filling in response to mineral S availability, the partitioning of S and N was also studied at the reproductive stages using an original experimental design based on a double  $^{34}\text{S-SO}_4^{2-}$  and  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  labelling method.

A complex regulatory crossroads between S, N and C metabolism is required for the control of S assimilation (Kopriva and Rennenberg, 2004) and distribution at the whole plant level. As reported by Ahmad and Abdin (2000b), photosynthesis in the leaves of *Brassicaceae* is influenced by S fertilization. In response to S restrictions applied at different growth stages, the real photosynthesis capacity was altered in two fully expanded leaf ranks #9 and #13 characterised by different dates of emergence (a week before GS 32 and GS 53, respectively) (Figure VI-A-2). In addition to this decrease of photosynthesis, plant N and S amounts were significantly reduced in response to the LS32 treatments (Figures VI-A-4 and 5). On the other hand, the plant dry matter was not significantly affected by S restriction (Figure VI-A-3). This surprising observation in response to the sulphate restrictions would be explained by (i) a C assimilation sufficient to maintain the plant growth in spite of a reduced capacity of photosynthesis, and/or (ii) an improvement of nutrient recycling from leaves before they fall on the soil. In accordance with studies conducted in *Brassica oleracea* (Koralewska *et al.*, 2007) or in *Brassica napus* (Dubousset *et al.*, 2009) at the vegetative stage, this unaltered plant biomass production in response to mineral S limitations suggests a remobilization of endogenous S compounds that is sufficiently efficient to maintain growth.

Interestingly, when compared to the control, the dry matter of taproots was significantly reduced at GS 81 in response to the LS53 treatment whereas it showed an increase under LS32 conditions (Figure VI-A-3). Hoefgen and Nikiforova (2008) suggested that a restriction in sulphate promotes the formation of roots to provide adaptation for prospecting the available soil S, and this is likely due to the activation of auxin inducible genes. Similarly, in our study, LS32 treatment led to an increase in taproot biomass, which is associated with a preferential partitioning of the plant N in taproots (Figure VI-A-5). This response to LS32 treatment could reveal a particular sink status of taproots for N, in response to S restriction, which occurs at the early stages of development of oilseed rape (before bolting) and is followed by a weak remobilization of N-reserves in comparison to the control at the reproductive stage (Figure VI-A-5).

The results obtained for yield components and S or N harvest indices demonstrate that the mineral S availability between GS 32 and GS 53 would be a determinant for the seed filling process and final seed quality. In response to the LS32 treatment, seed S and N amounts were reduced and the seed composition changed not only in terms of quality but also in terms of maturation (associated with changes in morphology and colouring) (Figure VI-A-7A). While the number of total seeds was unchanged, the biomass of seeds and the number of viable seeds were greatly reduced by S restrictions. In response to the LS32 treatment, the content of oil, proteins and glucosinolates was significantly decreased in seeds (Figure VI-A-6C). Accordingly, it has been reported that the oil content is positively correlated with seed weight and negatively correlated with N content (Andersen *et al.*, 1996; Fismes *et al.*, 2000). Among the factors that have been shown to influence the seed glucosinolate content in oilseed rape, S supply is the most noticeable (Zhao *et al.*, 1994). Fatty acid composition was also notably changed in LS32 conditions with an increase in the proportion of palmitic acid (C16:0) (Table VI-A-2). Contrary to the type of fatty acid composition revealed by Ahmad and Abdin (2000a) in cases of S restriction, the proportion of oleic and linoleic acids in oil remained unchanged by the different sulphate availabilities applied in our study. While LS32 treatment provoked undesirable changes in seed quality that were associated with altered N use efficiency, the other LS treatment that comprised restrictions in sulphate supply at GS 70 illustrated an optimization of S mobilization (Figure VI-A-8) sufficient to produce seeds of high quality.

The LS53 treatment led to less drastic modifications than LS32 for yield components. In LS53 conditions, while the amount of S was significantly reduced (Figure VI-A-4), the dry matter and N amount in seeds remained similar to the control. As reported by Anderson and Fitzgerald (2001), the seed yield and S amount in plants that did not receive sufficient nutrients after anthesis (as LS70 treatment in our study) were similar to plants that received S throughout reproductive growth. The notable effect of LS53 and LS70 treatments was the decrease in glucosinolate content in mature seeds (Figure VI-A-6C). Considering that the presence of glucosinolates in seeds restricts the use of meal in animal feed (Zhao *et al.*, 1994), a limited fertilization with sulphate after GS 53 did not alter the seed quality for meal. Glucosinolates are secondary metabolites containing  $\beta$ -thioglucose, a sulphonated oxime moiety and a side chain. Their contents are closely related to S availability since each molecule of glucosinolates contains two or three S atoms (Sherer, 2001). At high sulphur fertilization rates, the concentration levels of glucosinolates may increase due to a drop in the



levels of available methionine, the precursor of alkene glucosinolates (Zhao *et al.*, 1994; Jankowski *et al.*, 2008). A decrease in glucosinolate content would also be related to the decrease in C assimilation associated with photosynthesis (Figure VI-A-2).

The major part of N in control plants was allocated to seeds and corresponded to  $61.1 \pm 3.4\%$  of total N (Figure VI-A-5). The importance of leaves in N allocation, storage and mobilization to seeds has been well established in oilseed rape (Noquet *et al.*, 2004; Malagoli *et al.*, 2005a). In contrast, the mechanisms involved in the distribution of S taken up by roots to the various sink tissues and its fate thereafter, are unclear (Hawkesford and De Kok, 2006). While Sunarpi and Anderson (1997a) reported that soybean leaves contribute little to mature seed S content, our work underlined that leaves of oilseed rape would be crucial, firstly for their role as a major organ for S storage (mainly in sulphate form), and secondly for their function in S remobilization towards seeds (Figure VI-A-9). Plants in our study accumulated about half of the total plant S in the leaves by late vegetative development (GS 70) (Figure VI-A-9). To sustain the S demand for growth under S restriction, a strong  $\text{SO}_4^{2-}$  mobilization was necessary. Such mobilization of  $\text{SO}_4^{2-}$  from leaves has been reported by Dubousset *et al.* (2009) in oilseed rape submitted to S limitation at the rosette stage. These authors have also demonstrated that the large  $\text{SO}_4^{2-}$  remobilization at the rosette stage (GS 18) was associated with an up-regulation of expression of *BnSultr4;1* and *BnSultr4;2* (encoding transporters involved in efflux of  $\text{SO}_4^{2-}$  from the vacuole) (Kataoka *et al.*, 2004; Parmar *et al.*, 2007). Therefore, in future investigations it should be interesting to verify whether S remobilisation from leaves of S-restricted plants observed in the present study at the stages of bolting, visible buds or the start of pod filling, is associated with the induction of the *BnSultr4;1* and *BnSultr4;2* transporters as already demonstrated at the rosette stage (Dubousset *et al.*, 2009).

Compared to the control, the restrictions in sulphate strongly reduced the S amounts in vegetative parts (Figure VI-A-4). Through mobilization, vegetative parts contributed to seed S content by about 30.6% of the total  $^{34}\text{S}$  in control plants whatever the date of the end of labelling (HS32, HS53, HS70), underlining a constant rate of mobilization from GS 32 and GS 70 (Figure VI-A-8). The  $^{34}\text{S}$  harvest index was superior to 70% in response to restrictions of sulphate applied at GS 32 (LS32), GS 53 (LS53) or GS 70 (LS70). Sunarpi and Anderson (1997a) have reported that S-stressed soybeans fulfilled only 13% of the seed need for S through mobilization. This emphasizes the importance of the S reserve level in vegetative tissues and its subsequent mobilization in oilseed rape. While half of the total  $^{15}\text{N}$  in control plants was distributed to seeds, it was reduced in LS32 conditions to  $37.1 \pm 4.0\%$  and remained

unchanged in response to LS53 and LS70 treatments (Figure VI-A-8). Thus, in response to moderate S restriction (such as LS53 or LS70), it appears that oilseed rape can optimize the mobilization of previously acquired S to seeds independently of N distribution. *A contrario*, the N remobilization processes seem to be modified by severe S limitation (LS32), suggesting that the level of mineral S availability may affect the N use efficiency.

## CONCLUSION

Overall, the data demonstrate that (i) oilseed rape can optimize the mobilization of S reserves from vegetative organs to seeds when grown under moderate soil S limitation, (ii) the mineral S availability between GS 32 and GS 53 would be a determinant of the seed filling process and seed quality, and (iii) severe sulphate restriction (at GS 32) impacts on both S and N remobilization processes. Analyzing responses to sulphate limitations applied at different growth stages on S and N partitioning reveals the extent of the parallel and specific responses of S and N metabolisms to this nutrient deficiency. By using stable isotopes ( $^{34}\text{S}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) as a tracer system (Monaghan *et al.*, 1999), the determination of S and N fluxes will help to characterize the contribution of each organ to seed S and N filling in relation to the growth stages submitted to sulphate restriction. A better understanding of the mechanisms involved in S and N distribution and recycling at the whole plant level would help to maintain seed quality and high oil yield of oilseed rape crops through an increase of S and N use efficiencies that are compatible with the sustainability of agricultural practices.

**Acknowledgement:** This work was supported by the French National Research Agency (program ANR-COSMOS n°ANR-05-JC05-51097) and by a Ph.D. grant for Mrs Lucie Dubousset from the French Ministry of Research. The authors thank Ms Marie-Paule Bataillé and Mr Raphaël Ségura for their technical help in S and N analyses. The authors wish to acknowledge Mr Patrick Beauclair for the setup of the photosynthesis measurements, and Mr Raphaël Ségura, Ms Anne-Françoise Ameline, and Ms Alexandra Girondé for their valuable help in the greenhouse experiment. We also are grateful to Mrs Michelle Coustenoble, Ms Josiane Pichon, Anne-Sophie Desfeux, Josette Bonnefoy, Virginie Séguin, Julie Levallois, Marie-Paule Bataillé, Bénédicte De Loynes d'Estrées, and to Mr Jérôme Dubousset for their casual assistance in the harvest process.

**Article 4 :**

**B- Is the remobilization of S and N reserves for seed filling of winter oilseed rape modulated by sulphate restrictions occurring at different growth stages?**

L. Dubousset<sup>1</sup>, P. Etienne<sup>1</sup>, J.C. Avice<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>*INRA, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutrition N.C.S., Esplanade de la Paix, F-14032, Caen, France.*

**Key words:** oilseed rape, sulphate restriction, <sup>34</sup>S and <sup>15</sup>N labelling, S remobilization efficiency, S utilization efficiency.

## ABSTRACT

How the remobilization of S and N reserves can meet the needs of seeds of oilseed rape subject to limitation of S fertilization remains largely unclear. Thus, this survey aims to determine the incidence of sulphate restriction (LS) applied at different growth stages (GS) on source/sink relationships for S and N, and on the dynamics of endogenous/exogenous S and N contributing to seed yield and quality. Sulphate restriction was applied at GS32 (bolting) for LS32, GS53 (visible bud) for LS53, or GS70 (start of pod filling) for LS70. Additionally, long term  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  and  $^{15}\text{NO}_3^-$  labelling was used to explore S and N partitioning at the whole plant level. In LS53, the sulphur remobilization efficiency (SRE) to seeds increased, but not enough to maintain seed quality. In LS32, an early S remobilization from leaves provided S for root, stem and pod growth but the subsequent demand for seed development was not met adequately and the N utilization efficiency (NUtE) was reduced when compared to the control. The highest SRE ( $65 \pm 1.2\%$  of the remobilized S) associated with an efficient foliar S mobilization (with minimal residual S concentrations of 0.1-0.2% DM), was observed under LS70 treatment, which did not affect yield components.

## I. INTRODUCTION

Sulphur (S) is an important nutrient for plant growth and development. In comparison with other crops such as cereals, oilseed rape (*Brassica napus* L.) requires a relatively large amount of mineral S (Zhao *et al.*, 1997). During the last two decades, the reduced atmospheric pollution by industries has resulted in a major reduction in S emissions and, as a consequence, S deposition into the soil has strongly declined, particularly in Western Europe (McNeill *et al.*, 2005). A deficiency in S can reduce yield and impacts on the quality of harvested products (Janzen and Bettany, 1984; McGrath and Zhao, 1996; Scherer, 2001). The technical centre for oilseed production in France (CETIOM) recommends systematic S fertilization for oilseed rape crops with about 30 kg S.ha<sup>-1</sup>. Therefore, more attention should be paid to S fertilization practices that need to be optimized to fulfil plant S requirements whilst minimizing cost. Similarly to N uptake (Rossato *et al.*, 2001), the S requirement of oilseed rape would depend on the stage of plant development and environmental conditions. Indeed, the S requirement is not stable during the growth cycle of oilseed rape: S uptake increased from stem extension to the start of the flowering, whereas little S uptake was generally (but not exclusively) observed during pod filling (McGrath and Zhao, 1996; Postma *et al.*, 1999).

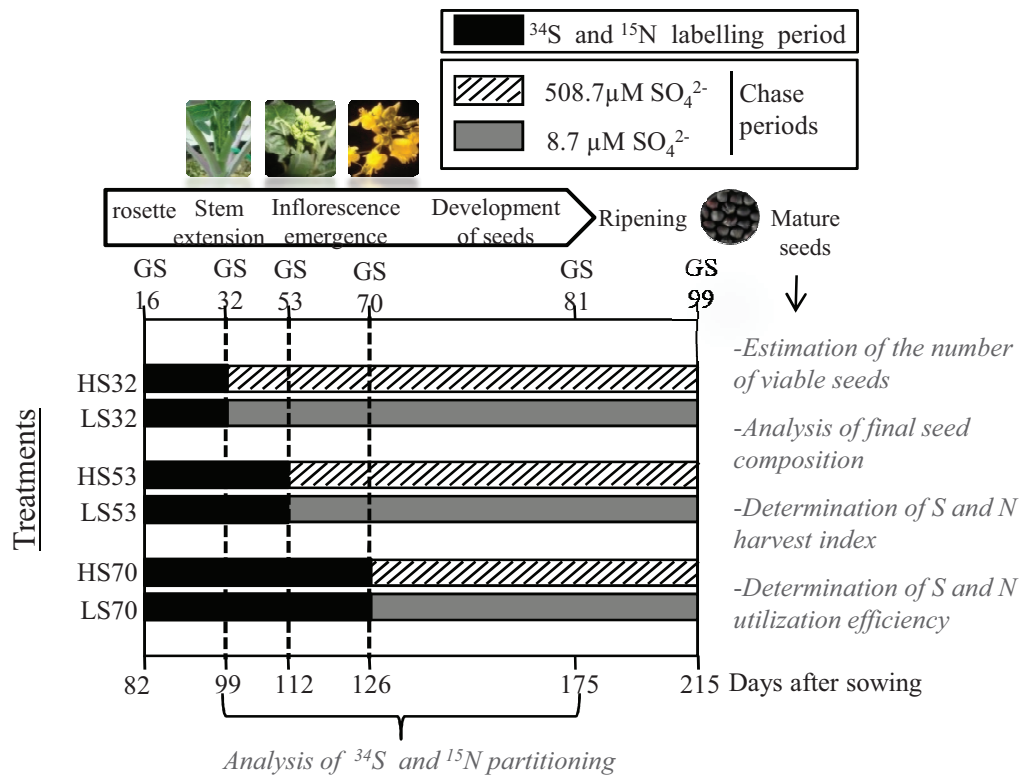
Winter oilseed rape can be used to reduce nitrogen (N) leaching during the autumn–winter period because of its high capacity to take up nitrate from the soil. N and S nutrition are tightly linked during the growth cycle (Reuveny *et al.*, 1980; Fismes *et al.*, 2000). N and S are both involved in amino-acid and protein synthesis. Restriction of S supply has been shown to depress the nitrate uptake and nitrate reductase activity in maize and spinach (Friedrich and Schrader, 1978; Prosser *et al.*, 2001), and can result in nitrate accumulation in leaves of oilseed rape (McGrath and Zhao, 1996). Fismes *et al.* (2000) reported that the S and N use efficiency of oilseed rape are synergistic at optimum rates and antagonistic at excessive levels of one of the elements. S fertilization is required to improve N-use efficiency and thereby maintain a sufficient oil content and fatty acid quality of seeds (Fismes *et al.*, 2000).

During vegetative development, winter oilseed rape is at the rosette stage in winter and the leaves represent a major store of nutrients which can be remobilized thereafter to sustain growth of reproductive tissues, as shown specifically for N (Schjoerring *et al.*, 1995; Rossato *et al.* 2001; Noquet *et al.* 2004; Malagoli *et al.*, 2005a). For instance, nearly 75 % of the N content in reproductive tissues of oilseed rape is derived from N mobilization occurring mostly in leaves and stems (Malagoli *et al.*, 2005b). Therefore, leaves emerging during the rosette stage would play a crucial role for seed filling and contribute to the maintenance of

seed yield (Noquet *et al.*, 2004). Thus, optimizing S fertilization requires a better understanding of (i) source-sink relationships for S at the whole plant level and (ii) processes of S mobilization by evaluating plant S partitioning in relation to the plant growth stage and N status from stem extension to harvest.

Oilseed rape may accumulate abundant amounts of sulphate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), but this anion is not mobilized efficiently from vegetative to reproductive tissues: the S harvest index (SHI, S amount in seeds divided by total S in the whole crop) is only about 20% (McGrath and Zhao, 1996), indicating that a large proportion of S is retained in the vegetative tissues. Sulphate stored in the vacuoles is the main form of S reserve in vegetative tissues (Blake-Kalff *et al.*, 1998; Scherer, 2001; Matula & Pechová, 2002). To sustain the S demand for growth of oilseed rape under S restriction occurring at the rosette stage, a strong S mobilization (mainly a  $\text{SO}_4^{2-}$  mobilization), associated with an up-regulation of *BnSultr4;1* and/or *BnSultr4;2* expression, (two transporters involved in efflux of sulphate from vacuoles, Kataoka *et al.*, 2004; Parmar *et al.*, 2007) was reported in leaves (Dubousset *et al.*, 2009). Smith and Lang (1988) reported that 90% of the S transported *via* the phloem is inorganic in soybean. Sunarpi and Anderson (1998) described S redistribution in S-deficient vegetative soybean (with an  $^{35}\text{S}$  pulse-chase labelling method) and reported that approximately 25% of the mobilized S was recycled as  $\text{SO}_4^{2-}$  via the root and the largest newly expanded leaf, which acts as an intermediary in the transport of S from the root to the youngest expanding leaves. S mobilization in suboptimal conditions of S fertilization was also examined in reproductive soybean (Sunarpi and Anderson 1997a; Naeve and Shibles, 2005). They reported that soybean leaves did not act as large reservoirs for S in conditions of suboptimal S fertilization. Nevertheless, under  $\text{SO}_4^{2-}$  sufficient conditions, it was shown that leaves of soybean supplied the seed with 20% of its total-S requirement (Naeve and Shibles, 2005). Therefore, in soybean, the amount of S mobilized from leaves at the reproductive stage appears to be reliant on the amount previously stored in roots and leaves. In oilseed rape, the source/sink relationships for S, and more particularly the contribution of leaves in the S reallocation to seeds, remains unclear. The concentration of S in leaves at early flowering was suggested to be the best index in predicting S deficiency in terms of seed yield by McGrath and Zhao (1996).

Although mobilization of S and N from vegetative tissues is likely to be important for seed filling in oilseed rape, very little is known about the efficiency (dynamics and amounts) of S and N mobilization to the reproductive tissues. How the limitation of S fertilization impacts on the remobilization processes of S and N reserves remains also largely unclear. To



**Figure VI-B-1 :** Schematic diagram of experimental design. Mineral S restriction (Low S, LS) was applied at GS 32 (bolting stage) for LS32, GS 53 (visible bud stage) for LS53, or GS 70 (start of pod filling) for LS70, until the end of the growth cycle (GS 99). During different periods (from GS 16 to GS 32, GS 16 to GS 53 or GS 16 to GS 70), the plants were supplied with  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  (1 atom% excess) and  $^{15}\text{NO}_3^-$  (2 atom% excess) in order to obtain plants with homogeneous  $^{34}\text{S}$  and  $^{15}\text{N}$  labelling before applying treatments. Plants were harvested at GS 32, GS 53, GS 70, GS 81 and GS 99.

address these questions, the aim of this study was to determine the impact of sulphate restrictions (Low S, LS *versus* High S, HS) applied at different growth stages of winter oilseed rape (GS 32, GS 53 or GS 70) on (1) the source/sink relationships for S and N at the whole plant level, (2) the remobilization of S and N reserves and their contribution to developing seeds, and (3) the seed yield and grain quality. To explore S and N reserve partitioning in oilseed rape, a greenhouse experiment was carried out for long term steady state labelling using stable isotopes as tracers, with  $^{34}\text{S-SO}_4^{2-}$  and  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  applied at the beginning of the stem elongation stage (GS 16) for different periods (17, 30 and 44 days), before applying S restriction. By this way, the dynamics of the mobilization of S and N compounds in response to different levels of mineral S availability during the subsequent chase periods could be accurately estimated. Additionally, to determine if the foliar residual S and N concentrations were related potentially to an efficient mobilization of S and N to seeds, the S and N concentration in fallen leaves in response to the different mineral S availabilities was also examined in relation to their nodal positions.

## II. MATERIALS AND METHODS

### II.1 Experimental treatments and Tissue sampling

The oilseed rape genotype chosen for this greenhouse experiment was *cv. Capitot*, a genotype well documented in terms of N use efficiency (Malagoli *et al.*, 2004 and 2005a and b; Gombert *et al.*, 2006; Etienne *et al.*, 2007, Desclos *et al.* 2008; 2009). After surface sterilization, seeds were germinated on vermiculite in 20 L tanks for 24 seedlings and grown with a thermoperiod of 20°C (day-16h) and 15°C (night-8h), on 25% Hoagland nutrient solution consisting of 1.25 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1.25 mM  $\text{KNO}_3$ , 0.5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2 mM EDTA, 2NaFe,3H<sub>2</sub>O, 14 μM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 5 μM  $\text{MnSO}_4$ , 3 μM  $\text{ZnSO}_4$ , 0.7 μM  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ , 0.7 μM  $\text{CuSO}_4$ , 0.1  $\text{CoCl}_2$ , renewed two times per week for 36 days. The plants were then submitted to 8°C (day-10h) and 4°C (night-14h) for 46 days for vernalisation with the same nutrient solution renewed two times per week. After this period of vernalisation, each plant was transferred to pots containing mixed 1/3 vermiculite and 2/3 perlite (one plant per pot) and submitted to a thermoperiod of 20°C (day) and 15°C (night). As indicated in Fig. 1, during different periods of growth (from GS 16 (rosette stage) to GS 32



(bolting stage), GS 53 (visible bud stage) or GS 70 (start of pod filling)), plants were supplied with  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  (1 atom% excess) and  $^{15}\text{NO}_3^-$  (2 atom% excess) in order to obtain plants with homogeneous  $^{34}\text{S}$  and  $^{15}\text{N}$  labelling. Each day, the nutrient solution (25% Hoagland for HS control plants *i.e.* High S (HS) treatment) was supplied automatically in an increasing volume as a function of the growth stages: 90, 120, 150 and 180 mL per plant at the start of the bolting stage, the visible bud stage, the flowering stage, and the seed maturation stage, respectively. Mineral S restriction (Low S (LS) treatments) corresponding to  $8.7 \mu\text{M SO}_4^{2-}$  was applied at GS 32 for LS32, GS 53 for LS53, or GS 70 for LS70, until the end of the growth cycle (GS99). At final harvest, the number of mature seeds per plant was accurately determined at GS 99 for four replicates per treatment. Seeds were then used for the test of viability and the determination of seed composition. At each date of harvest, the different plant parts (lateral roots, taproot, leaves, stem, floral stem, pod walls and seeds) were weighed, freeze-dried and then ground to a fine powder for elemental and isotope analyses. Old, mature and young leaves were collected after determination of the relative chlorophyll concentration using the non-destructive SPAD (Soil Plant Analysis Development) chlorophyll meter (Minolta, SPAD-502 model), and measurement of the leaf area using a LI-COR 300 area meter (LI-COR, Inc. Lincoln, Nebraska, USA). At each date of harvest, the leaves characterized by a bottom position on the plant and a chlorophyll concentration inferior to 55 SPAD units were clustered in “old leaves”. Then, the upper leaves characterized by chlorophyll concentrations and areas higher than 55 SPAD units and  $55 \text{ cm}^2$  were clustered in “mature leaves”. Finally, the younger leaves characterized by an area lower than  $55 \text{ cm}^2$  were clustered in “young leaves”.

The leaf rank number was determined according to the date of leaf emergence using a labelled collar suspended on the petiole of each leaf rank after maturity. Thus, changes in the S and N concentrations in fallen leaves were monitored for each nodal position, from seedling to the seed maturation stage. These leaf samples were freeze-dried, weighed for DM determination and then ground to a fine powder for S and N analyses.

## II.2 Germination test for determination of seed viability

The viability of seeds produced by plants submitted to the different S availabilities was tested by assessment of seed germination. Mature seeds obtained for each treatment were

germinated on Whatman filter paper soaked with sterile water within petri dishes (12 × 12 cm). Fifty seeds per biological repetition (n=6 for HS and n=4 for each LS treatment) were sown on water for 7 days with a cycle of 8-h-dark (18°C) / 16-h-light (25°C). Three technical replicates were performed for each biological repetition. The percentage of plantlets with normal development indicated the number of viable seeds for each S-treatment.

### II.3 Determination of oil, proteins and glucosinolate contents by NIRS

All the seed samples were scanned on a monochromator Near Infra Red System (NIRSystem model 6500, FOSS NIRSystem Inc, Silver Spring, MD, USA) equipped with the transport module, in the reflectance mode. Intact seeds (about 5 g) were placed in a standard ring cup and scanned. The results were predicted from an external calibration established for oil and total glucosinolate content (CRAW, Gembloux, Belgium). Three determinations were performed for each sample. The results were given as a percentage of oil or proteins per seed dry matter (DM) and in  $\mu\text{mol}$  of total glucosinolates per seed DM.

### II.4 S, $^{34}\text{S}$ , N, $^{15}\text{N}$ analysis

Freeze-dried samples were ground to fine powder, weighed and placed into tin analysis capsules. Both total S and N contents were determined with a continuous flow isotope mass spectrometer (Isoprime, GV Instruments, Manchester, UK) linked to an analyser (EA3000, EuroVector, Milan, Italy). Stable isotope abundance ( $A$ ) was calculated as follows:

$$A = 100 \times R_{\text{sample}} / (R_{\text{sample}} + 1)$$

where  $R_{\text{sample}}$  corresponded to the isotopic ratio for N or S.

For each sample, the  $\delta^{34}\text{S}$  were collected and data were normalized using V-CDT ( $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$  ratio: 0.04415206), an internationally accepted isotope standard for S analysis.

$$R_{\text{sample}} = (\delta^{34}\text{S} \times 0.04415206 / 1000) + 0.04415206.$$

To determine the  $^{34}\text{S}$  amount in excess, the natural isotope abundance of oilseed rape (4.2549%) was withdrawn to the value of  $A$ .

For each sample, the  $\delta^{15}\text{N}$  were collected and data were normalized using natural "Ratm  $\text{N}_2$ " (corresponding to  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  ratio of atmosphere) as the isotope standard for N analysis:

$$R_{\text{sample}} = (\delta^{15}\text{N} \times \text{Ratm } \text{N}_2 / 1000) + \text{Ratm } \text{N}_2.$$

The natural  $^{15}\text{N}$  abundance (0.3731%) was used for calculation of the amount of  $^{15}\text{N}$  in excess.

## II.5 Calculation of S and N partitioning and remobilisation

Long periods of labelling allow an homogenous distribution of tracers in different organs and different biochemical fractions containing S and/or N. Normalization of the amounts of absorbed  $^{34}\text{S}$  and  $^{15}\text{N}$  is carried out using the average amount of each of these isotopes found throughout the whole plant for each harvest date and treatment submitted to similar periods of labelling. After normalization, the partitioning of  $^{34}\text{S}$  and  $^{15}\text{N}$  in plants is expressed in the percentage of total  $^{34}\text{S}$  and  $^{15}\text{N}$ . The method of calculation of S flows is presented below and can be transposed to the determination of N flows. The calculations of flows of remobilized S depend on the source or sink status of each organ. For the source organs, this is characterized by a loss of  $^{34}\text{S}$  amount for a period  $\Delta t$ . Between the dates  $t_0$  and  $t_0 + \Delta t$ , the S amount remobilized (QSR<sub>source</sub>) corresponded to:

$$\text{QSR}_{\text{source}} = \text{QSt}_0 \times (\text{Q}^{34}\text{St}_0 - \text{Q}^{34}\text{St}_{t_0+\Delta t}) / \text{Q}^{34}\text{St}_0$$

where  $\text{Q}^{34}\text{St}_0$  = amount of  $^{34}\text{S}$  in the source organ at  $t_0$ ,

$\text{Q}^{34}\text{St}_{t_0+\Delta t}$  = amount of  $^{34}\text{S}$  in the source organ at  $t_0+\Delta t$ ,

$\text{QSt}_0$  = amount of S in the source organ at  $t_0$ ,

$\Delta t$  = period of chase, for example between GS70 and GS81.

For the sink organs, this is characterized by a gain of  $^{34}\text{S}$  amount for a period  $\Delta t$ . Between the dates  $t_0$  and  $t_0 + \Delta t$ , the S amount derived from remobilization (QSR<sub>sink</sub>) corresponded to:

$$\text{QSR}_{\text{sink}} = \text{Q}^{34}\text{St}_{t_0+\Delta t} \times \sum_{(t_0 \rightarrow t_0+\Delta t)} \text{QSR}_{\text{source}} / \sum_{(t_0 \rightarrow t_0+\Delta t)} \text{Q}^{34}\text{S}$$

**Table VI-B-1:** DM of total seeds and number of viable seeds, seed composition evaluated by NIRS in total seeds, S Harvest Index (SHI) and N Harvest Index (NHI) at GS99 in plants subject to HS, LS32, LS53, and LS70 conditions. Details about HS and LS treatments are given in Fig. 1. The values correspond to the mean  $\pm$ SE (the number of viable seeds, SHI and NHI was determined with  $n=12$  for HS,  $n=4$  for LS32, LS53, and LS70; the seed composition was determined with  $n=6$  for HS,  $n=4$  for LS32, LS53, LS70 with three technical repetitions for each analysis). Different letters indicate that mean values are significantly different ( $p<0.05$ ). The highest values obtained for each parameter are in bold.

	DM of total seeds produced per plant(g)	Number of viable seeds produced per plant	Oil content in mature seeds (%DM)	Protein content in mature seeds (%DM)	Glucosinolate content in seeds ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ DM)	SHI (% of total S in plant)	NHI (% of total N in plant)
<b>HS</b>	<b>11.6 <math>\pm</math>0.61<sup>b</sup></b>	<b>2398 <math>\pm</math>146<sup>b</sup></b>	<b>45 <math>\pm</math>0.5<sup>c</sup></b>	<b>23 <math>\pm</math>0.3<sup>b</sup></b>	<b>14 <math>\pm</math>0.4<sup>c</sup></b>	26 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	<b>49 <math>\pm</math>2.1<sup>b</sup></b>
<b>LS32</b>	6.30 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>	313 $\pm$ 233 <sup>a</sup>	32 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	21 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	4.2 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	25 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	35 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>
<b>LS53</b>	<b>11.6 <math>\pm</math>0.81<sup>b</sup></b>	<b>2325 <math>\pm</math>206<sup>b</sup></b>	43 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	<b>22 <math>\pm</math>0.2<sup>ab</sup></b>	2.5 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	45 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>	<b>54 <math>\pm</math>1.9<sup>b</sup></b>
<b>LS70</b>	<b>11.7 <math>\pm</math>0.49<sup>b</sup></b>	<b>2502 <math>\pm</math>109<sup>b</sup></b>	<b>45 <math>\pm</math>0.2<sup>bc</sup></b>	<b>23 <math>\pm</math>0.2<sup>b</sup></b>	8.3 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	<b>55 <math>\pm</math>1.7<sup>c</sup></b>	<b>53 <math>\pm</math>2.7<sup>b</sup></b>

**Table VI-B-2:** S utilization efficiency (mg of mature seed DM /mg of S in shoots) and N utilization efficiency (mg of mature seed DM /mg of N in shoots) at GS99 in HS, LS32, LS53, and LS70 conditions. Details about HS and LS treatments are given in Fig. 1. The values correspond to the mean  $\pm$ SE ( $n=12$  for HS,  $n=4$  for LS32, LS53, LS70). Different letters indicate that mean values are significantly different ( $p<0.05$ ).

	S utilization efficiency (mg of mature seed DM /mg of S in shoots)	N utilization efficiency (mg of mature seed DM /mg of N in shoots)
<b>HS</b>	81 $\pm$ 5.8 <sup>a</sup>	32 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>
<b>LS32</b>	203 $\pm$ 26 <sup>b</sup>	18 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>
<b>LS53</b>	<b>461 <math>\pm</math>24<sup>c</sup></b>	<b>48 <math>\pm</math>5.6<sup>c</sup></b>
<b>LS70</b>	<b>379 <math>\pm</math>24<sup>c</sup></b>	39 $\pm$ 3.9 <sup>bc</sup>

where  $Q^{34}\text{S}_{t_0+\Delta t}$  = amount of  $^{34}\text{S}$  in the sink organ at  $t_0+\Delta t$ ,

$\Sigma_{(t_0 \rightarrow t_0+\Delta t)} \text{QSR}_{\text{source}}$  = total amounts of S remobilized from source organs between  $t_0$  et  $t_0+\Delta t$ ,

$\Sigma_{(t_0 \rightarrow t_0+\Delta t)} Q^{34}\text{S}$  = total amounts of  $^{34}\text{S}$  accumulated in the sink organs between  $t_0$  et  $t_0+\Delta t$ .

The inflow of S taken up between two dates (*i.e.* for the period  $\Delta t$ ) was calculated by subtracting the S derived from remobilization between these two dates from the change in total S amount for this period.

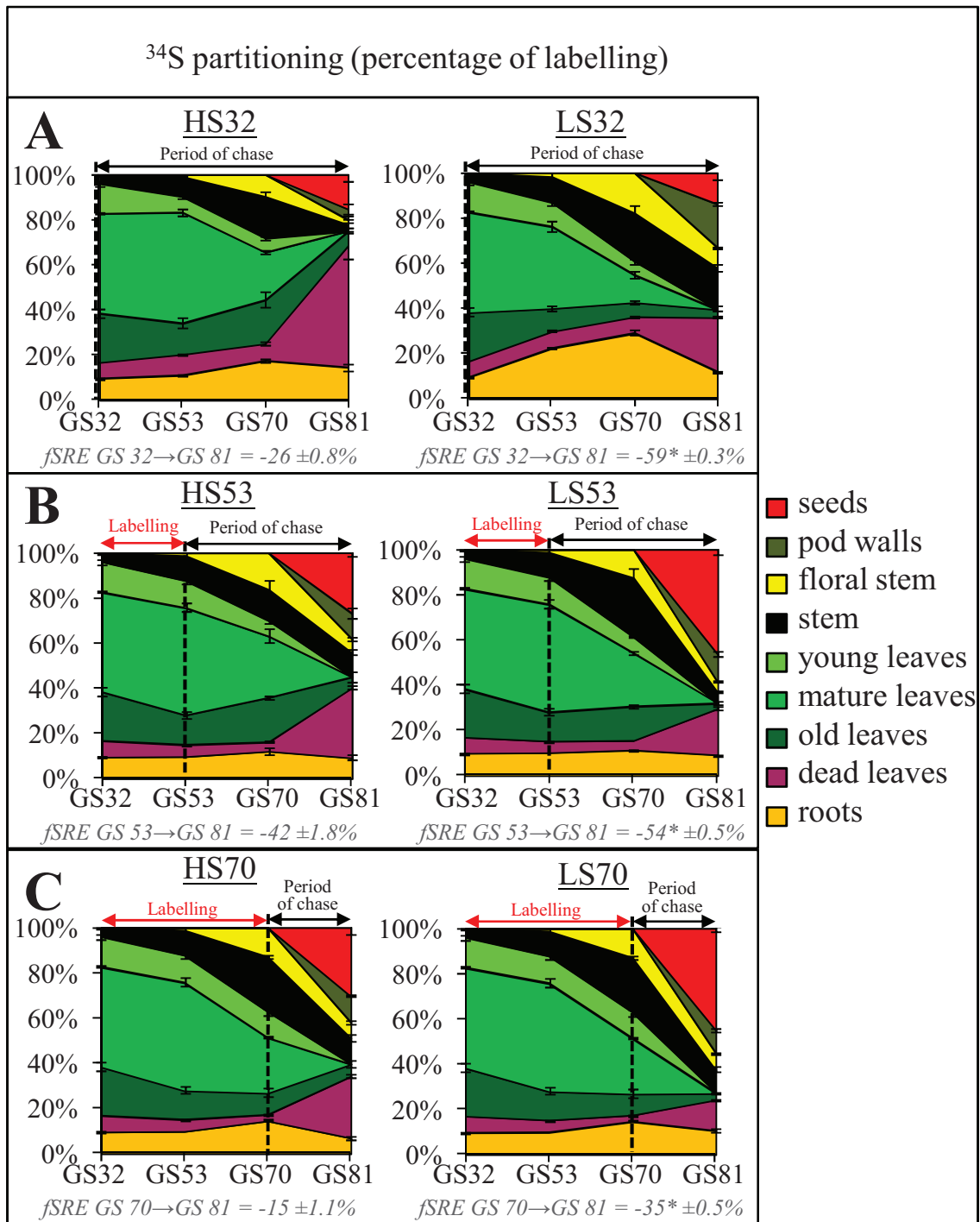
## II.6 Statistics

The normality of the data was studied with the Ryan-Joiner test at 95%. Analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test to compare the means were performed with MINITAB13 on *Windows* (Minitab Inc, State College, PA, USA). When the normality law of the data was not respected, the non-parametric test of Kruskal-Wallis was carried out and followed by Mood's median test. Statistical significance was postulated at  $P < 0.05$ .

## III. RESULTS

### III.1 Effects of different sulphate availabilities on seed yield and quality at GS 99

In LS32 conditions, the global seed DM was reduced at GS 99 by almost 45% (from  $11.6 \pm 0.61$  g in control (HS) to  $6.30 \pm 0.66$  g per plant in LS32, Table VI-B-1). Nevertheless, the number of viable seeds highly decreased in response to LS32 treatment (Table VI-B-1) and corresponded to  $15.3 \pm 1.6\%$  of the total seeds produced. Compared to control, the oil and protein content was significantly decreased by the LS32 treatment. In addition, a strong decrease in glucosinolate content was observed in all LS treatments and especially in LS32 ( $-69 \pm 6.7\%$ ) and LS53 ( $-82 \pm 3.1\%$ ) (Table VI-B-1). The oil content in seeds was decreased in



**Figure VI-B-2 :**  $^{34}\text{S}$  partitioning (expressed as the percentage of total  $^{34}\text{S}$  labelling) in the different tissues of the plants from GS 32 to GS 81 in HS32 and LS32 (A), HS53 and LS53 (B), and HS70 and LS70 conditions (C). Vertical bars indicate  $\pm SE$  of the mean ( $n=4$ ). The foliar S Remobilization Efficiency ( $fSRE$ , corresponding to the foliar loss of  $^{34}\text{S}$  between two growth stages, in percentage of total  $^{34}\text{S}$  labelling) is indicated for each chase period and asterisks indicate that mean values in LS conditions are significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

LS53 conditions (Table VI-B-1). In contrast with LS32, the protein content was not affected by the LS53 treatment as compared to the control. Interestingly, the oil and protein content in seeds was not significantly modified by the LS70 treatment (Table VI-B-1).

### **III.2 Effects of different sulphate availabilities on SHI, NHI, SUtE and NUtE**

The S Harvest Index (SHI = S amount in seeds expressed as % of total S amount in plant at GS 99) corresponded to  $26 \pm 1.3\%$  of total S in control plants and was similar in LS32 conditions, whereas it reached  $45 \pm 1.8\%$  and  $55 \pm 1.7\%$  in LS53 and LS70 conditions, respectively (Table VI-B-1). The highest SHI was thus obtained in LS70 conditions and was 2-fold higher than in control, suggesting a better targeting of S mobilization to seeds in response to this treatment. The N Harvest Index (NHI = N amount in seeds expressed as % of total N amount in plant at GS 99) was  $35 \pm 3.9\%$  in LS32 conditions whereas it reached  $49.1 \pm 2.1\%$  in control (Table VI-B-1). The other LS treatments did not affect the seed N amount and NHI in comparison with control.

The production of dry mass (DM) of mature seeds was used to calculate the S or N utilization efficiency (SUtE and NUtE, expressed as seed DM produced per unit of S or N accumulated in vegetative shoots, Table VI-B-2). The highest values of SUtE were obtained in LS53 and LS70 conditions and reached  $461 \pm 24$  and  $379 \pm 24$  mg of mature seed DM per mg of S in shoots, respectively (Table VI-B-2). Compared with control, the NUtE was significantly increased only in LS53 conditions (with  $48 \pm 5.6$  versus  $32 \pm 2.1$  mg of mature seeds DM per mg of N in shoots in HS).

### **III.3 Effects of different sulphate availabilities on the dynamics of $^{34}\text{S}$ partitioning**

Using double  $^{34}\text{S}$  and  $^{15}\text{N}$  long-term labelling it was possible to estimate for the chase period the distribution of S-reserves in plants. Fig. 2 illustrates the  $^{34}\text{S}$  partitioning from GS 32 to GS 81 in response to the different sulphate availabilities. The analysis of  $^{34}\text{S}$  partitioning

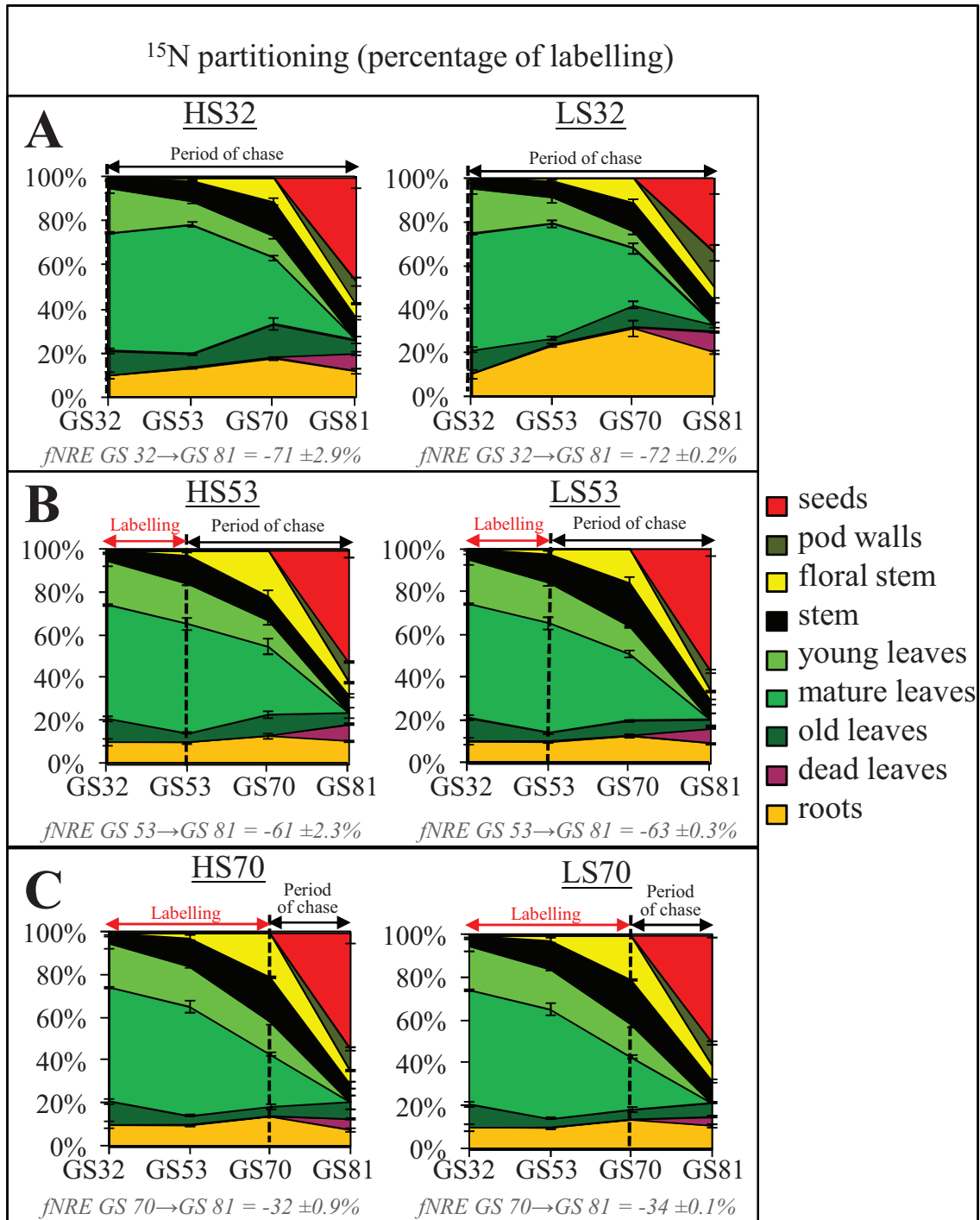
as a function of growth stages allows a determination of sink/source relationships for S at the whole plant level.

In HS32 conditions, all leaves (young, mature, old and dead leaves) contained the largest proportion of the total  $^{34}\text{S}$  from GS 32 to GS 81. As a consequence, the foliar  $^{34}\text{S}$  Remobilization Efficiency (fSRE, corresponding to the loss of  $^{34}\text{S}$  in leaves between two growth stages, expressed in a percentage of total  $^{34}\text{S}$  labelling) was only of  $-26 \pm 0.8\%$  between GS 32 and GS 81 (Figure VI-B-2A). At GS 70, the weak proportion of  $^{34}\text{S}$  remobilized from leaves of HS32 plants was transiently allocated towards the stems and roots. After GS 70, the proportion of  $^{34}\text{S}$  in roots remained stable ( $15 \pm 1.8\%$ ) and high amounts of  $^{34}\text{S}$  were lost in fallen leaves at GS 81 ( $54 \pm 6.0\%$ ; Figure VI-B-2A).

Compared with HS32, LS32 treatment increased the proportion of  $^{34}\text{S}$  allocated to stems, floral stems and pod walls from GS 32 (bolting stage) to GS 81 (seed colouring) (Figure VI-B-2A). Interestingly, in response to LS32 treatment, roots became a transient major sink organ (until GS 70) before becoming a source for S (from GS 70 to GS 81) (Figure VI-B-2A). From the beginning of the chase period,  $^{34}\text{S}$  stored in the mature and old leaves of LS32 plants was mobilized earlier than in HS32 conditions, and this  $^{34}\text{S}$  re-allocation was to the benefit of roots and stems. The residual  $^{34}\text{S}$  in dead leaves was strongly decreased at GS 81 from  $54 \pm 6.0\%$  in HS32 to  $24 \pm 0.3\%$  of total  $^{34}\text{S}$  in LS32. Nevertheless, a remobilization from all leaves to other plant parts did not take place between GS 70 and GS 81 in LS32 conditions. Indeed, the total proportion of  $^{34}\text{S}$  in all leaves remained stable between GS 70 and GS 81 ( $28 \pm 0.3\%$ , Figure VI-B-2A).

In HS53, the  $^{34}\text{S}$  partitioning from GS 32 to GS 53 illustrates the allocation associated with the S uptake before GS 53. Comparison between the  $^{34}\text{S}$  partitioning observed at the GS 32 and GS 53 periods in HS32 (Figure VI-B-2A) and in HS53 (Figure VI-B-2B), underlines an allocation of S taken up by stems and young leaves from GS 32 to GS 53. After GS 53 (start of the chase period, Figure VI-B-2B), the  $^{34}\text{S}$  partitioning illustrates the pattern of remobilization of the S previously acquired in the plant. The fSRE from GS 53 to GS 81 ( $-42 \pm 1.8\%$  for HS53) is higher than the fSRE obtained between GS 32 and GS 81 ( $-26 \pm 0.8\%$  for HS53) (Figure VI-B-2B). The mobilization of  $^{34}\text{S}$  in leaves was associated with an increasing sink status, firstly of the floral stems (at GS 70) and secondly of pod walls and seeds (at GS 81). Roots and stems did not act as source or sink organs for  $^{34}\text{S}$  between GS 53 and GS 81 in HS53 conditions (Figure VI-B-2B). In response to LS53 conditions, compared with HS53, the





**Figure VI-B-3 :**  $^{15}\text{N}$  partitioning (expressed as the percentage of total  $^{15}\text{N}$  labelling) in the different tissues of the plants from GS 32 to GS 81 in HS32 and LS32 (A), HS53 and LS53 (B), and HS70 and LS70 conditions (C). Vertical bars indicate  $\pm\text{SE}$  of the mean ( $n=4$ ). The foliar N Remobilization Efficiency ( $f\text{NRE}$ , corresponding to the foliar loss of  $^{15}\text{N}$  between two growth stages, in percentage of total  $^{15}\text{N}$  labelling) is indicated for each chase period and asterisks indicate that mean values are significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

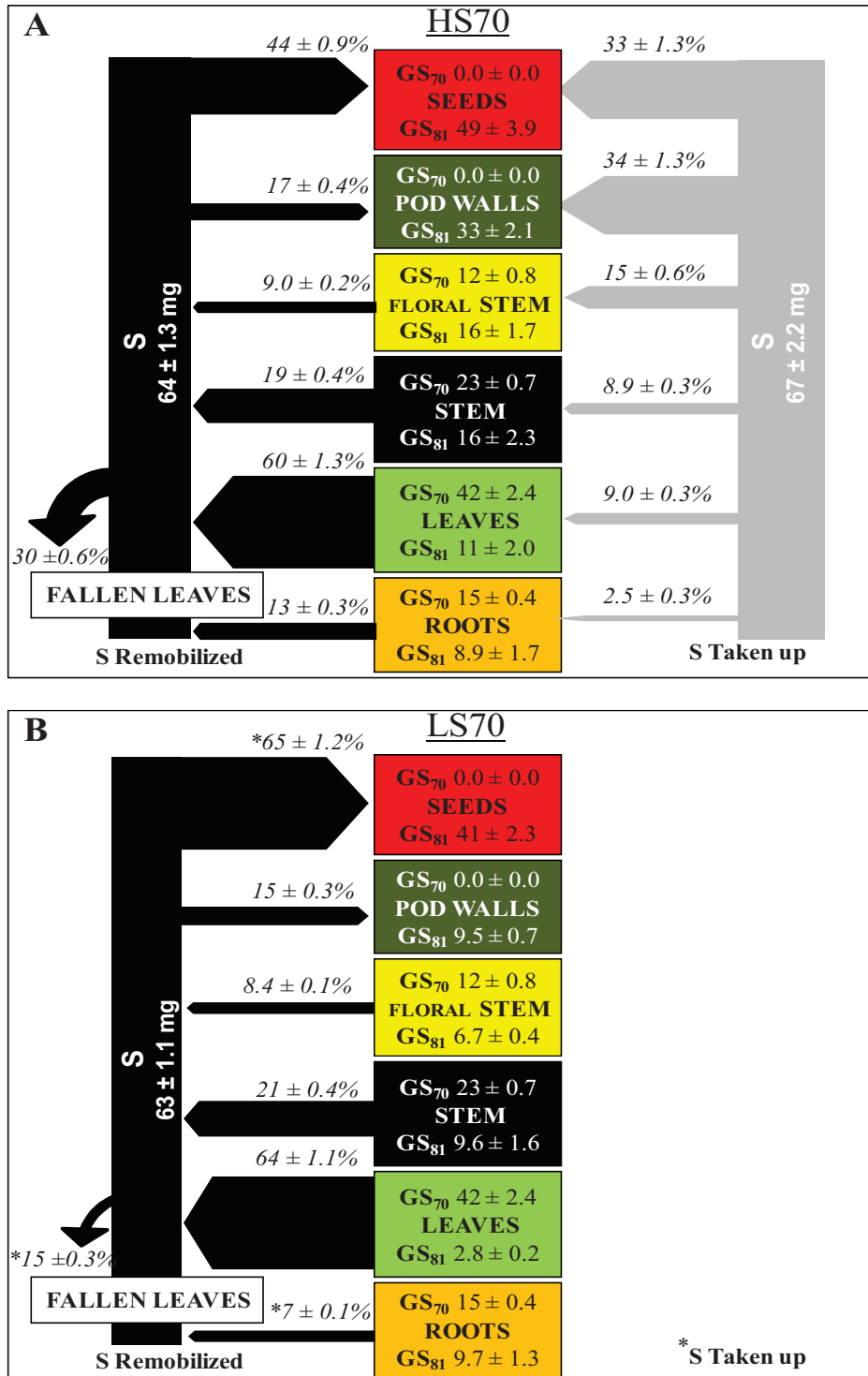
$^{34}\text{S}$  was allocated particularly to stems at GS 70 (but only transiently), while the  $^{34}\text{S}$  accumulated in leaves decreased. Contrary to the LS32 conditions, the LS53 treatment did not provoke transient redistribution of  $^{34}\text{S}$  towards roots. In comparison with HS53, the final  $^{34}\text{S}$  partitioning in LS53 conditions was characterized by the highest redistribution of  $^{34}\text{S}$  in seeds (corresponding to  $46 \pm 2.0\%$  in LS53 *versus*  $27 \pm 1.7\%$  of total  $^{34}\text{S}$  in HS53 at GS 81) whereas a better remobilization of  $^{34}\text{S}$  reserves was noticed in stems and leaves (Figure VI-B-2B). Consequently, at GS 81, dead leaves of LS53 contained  $20.8 \pm 0.5\%$  of total  $^{34}\text{S}$  *versus*  $31.1 \pm 0.7\%$  in HS53.

While a large amount of  $^{34}\text{S}$  was allocated to stems before GS 70 in HS70 conditions, the main source of  $^{34}\text{S}$  for seed filling was the leaves with a fSRE of  $-15 \pm 1.1\%$  from GS 70 to GS 81 (Figure VI-B-2C). This decline in  $^{34}\text{S}$  from leaves was also associated with the decrease of  $^{34}\text{S}$  in the roots and stems and this  $^{34}\text{S}$  was re-allocated towards seeds which reached  $30 \pm 3.0\%$  at GS 81 (HS70, Figure VI-B-2C). As compared with HS70, the decrease in  $^{34}\text{S}$  in leaves was more important in LS70 conditions as indicated by the value of fSRE ( $-35 \pm 0.5\%$ ) observed between GS 70 and GS81. Indeed, the fallen leaves corresponded finally to  $14 \pm 0.5\%$  in LS70 *versus*  $27 \pm 0.8\%$  of total  $^{34}\text{S}$  in HS70 at GS 81 (Figure VI-B-2C). The  $^{34}\text{S}$  in seeds finally reached  $45 \pm 3.0\%$  of total  $^{34}\text{S}$  in LS70.

### III.4 Effects of different sulphate availabilities on the dynamics of $^{15}\text{N}$ partitioning

The changes of  $^{15}\text{N}$  partitioning from GS 32 to GS 81 in response to the different S treatments are given in Figure VI-B-3.

In HS conditions, while the proportions and dynamics of  $^{15}\text{N}$  were similar to  $^{34}\text{S}$  in roots (Figures VI-B-3 and 2), leaves contained a large proportion of  $^{15}\text{N}$  which, contrary to  $^{34}\text{S}$ , highly decreased before GS 81. The foliar N Remobilization Efficiency (fNRE, corresponding to the loss of  $^{15}\text{N}$  in leaves between two growth stages, expressed as a percentage of total  $^{15}\text{N}$  labelling) reached on average,  $-71 \pm 2.9\%$  between GS 32 and GS 81 (Figure VI-B-2A). After GS 70, leaves were the main source of  $^{15}\text{N}$  for seed filling and the final proportion of  $^{15}\text{N}$  in seeds reached  $47 \pm 5.2\%$  in HS32 (Figure VI-B-3A).



**Figure VI-B-4 :** Flows in percentage of remobilized S (determined on the basis of  $^{34}\text{S}$  enrichment, see Materials and Methods for details) and S taken up (estimated from the unlabelled S), and the S amount present at GS 70 and GS 81 in seeds (in mg in seeds), pod walls, floral stems, stems, leaves, and roots of oilseed rape for control plants (HS70, **A**) and S deficient plants (LS70, **B**) during the reproductive stage. Values are given as the mean  $\pm$  s.e. ( $n = 16$  for the flows,  $n = 4$  for the S amounts in tissues). The thickness of the arrows represents the relative importance of each flow to or from a tissue related to the S taken up or S remobilized, and asterisks indicate that mean values are significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

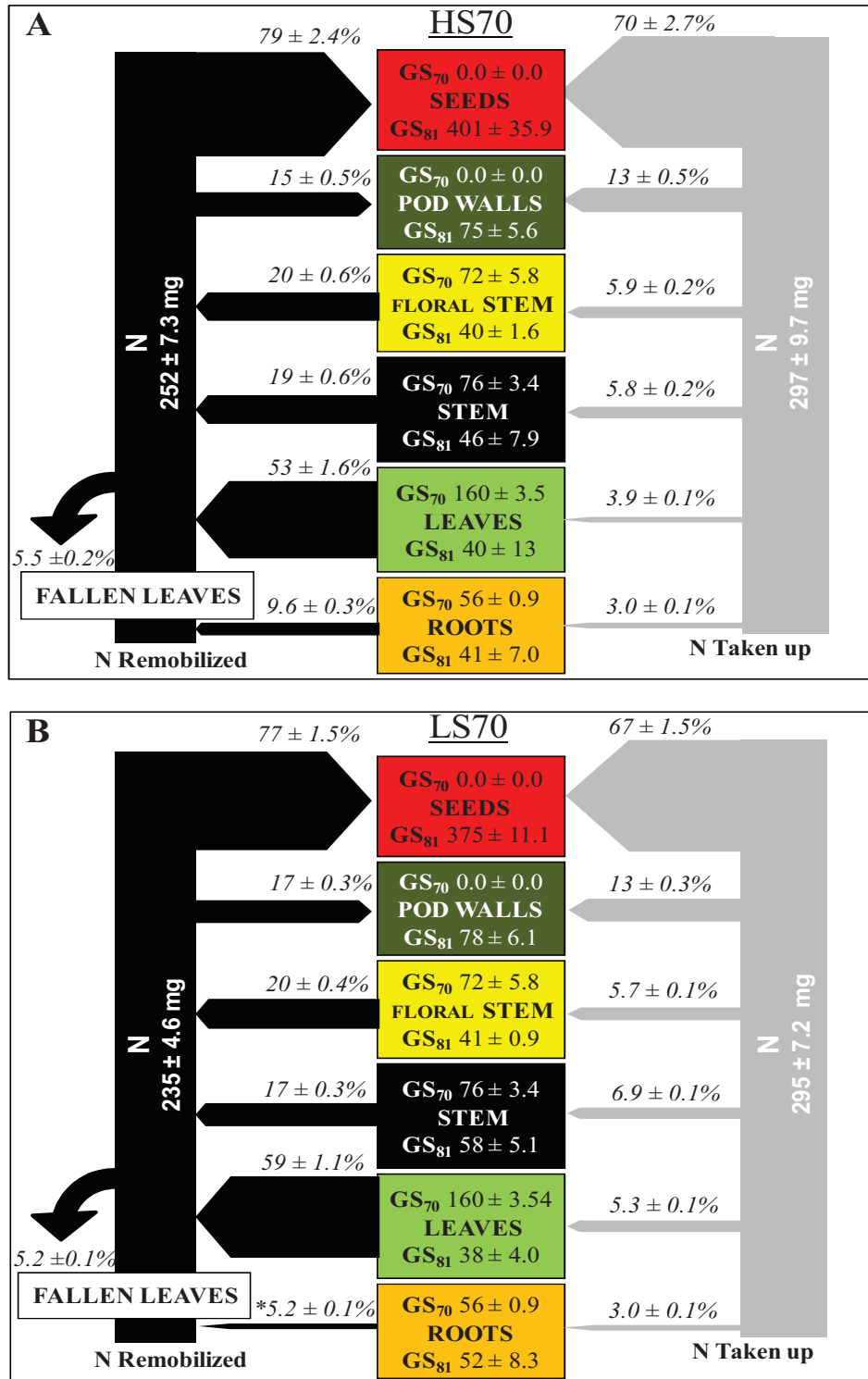
In response to LS32 treatment, the proportion of  $^{15}\text{N}$  transiently and strongly increased in roots until GS 70 before becoming a source for  $^{15}\text{N}$  from GS 70 to GS 81 (Figure VI-B-3A). At GS 70, the  $^{15}\text{N}$  in roots of plants submitted to LS32 conditions reached  $31 \pm 3.7\%$  of total  $^{15}\text{N}$  versus only  $18 \pm 0.8\%$  in HS32. Finally, the  $^{15}\text{N}$  found in seeds at GS 81 in response to the LS32 treatment reached  $34 \pm 7.3\%$  of the total  $^{15}\text{N}$ , and the  $^{15}\text{N}$  in roots remained high (Figure VI-B-3A).

Contrary to LS32, the LS53 and LS70 treatments did not significantly alter the partitioning of  $^{15}\text{N}$  in comparison with the respective controls HS53 and HS70 (Figures VI-B-3B and C). In LS53 and LS70 conditions, the  $^{15}\text{N}$  reallocated to seeds corresponded to more than half of the total  $^{15}\text{N}$  (Figures VI-B-3B and C). Globally, all the leaves constitute the main source of  $^{15}\text{N}$  for seed  $^{15}\text{N}$  filling (Figures VI-B-3B and C). Whatever the LS treatments, the rate of  $^{15}\text{N}$  remobilization from leaves (fNRE) was not significantly different to control conditions. For instance, between GS 53 and GS 81 (Figure VI-B-3B), fNRE reached  $-61 \pm 2.3\%$  and  $-63 \pm 0.3\%$  in HS53 and LS53 conditions, respectively.

### III.5 Effects of different sulphate availabilities on S and N flows between GS70 and GS81

Contrary to LS32 and LS53, the LS70 treatment consisting in a restriction of sulphate supply since GS 70 (*i.e.* start of pod filling) did not alter seed yield and quality. Besides, LS70 treatment did not affect the NUtE (Table VI-B-2) and  $^{15}\text{N}$  partitioning (Figure VI-B-3), and led to the most efficient seed production with high SHI (Table VI-B-1) and SUtE (Table VI-B-2). In response to this treatment, the fSRE was more than doubled in comparison with control ( $-35 \pm 0.5\%$  versus  $-15 \pm 1.1\%$  in HS70 between GS 70 and GS 81) (Figure VI-B-2C). In these circumstances, the allocation of S and N taken up from the soil and the endogenous S and N remobilizations during the reproductive phase of oilseed rape development were examined on the basis of  $^{34}\text{S}$  and  $^{15}\text{N}$  enrichment (see Materials and methods for details) and illustrated for HS70 (Figures VI-B-4A and 5A) and LS70 conditions (Figures VI-B-4B and 5B).

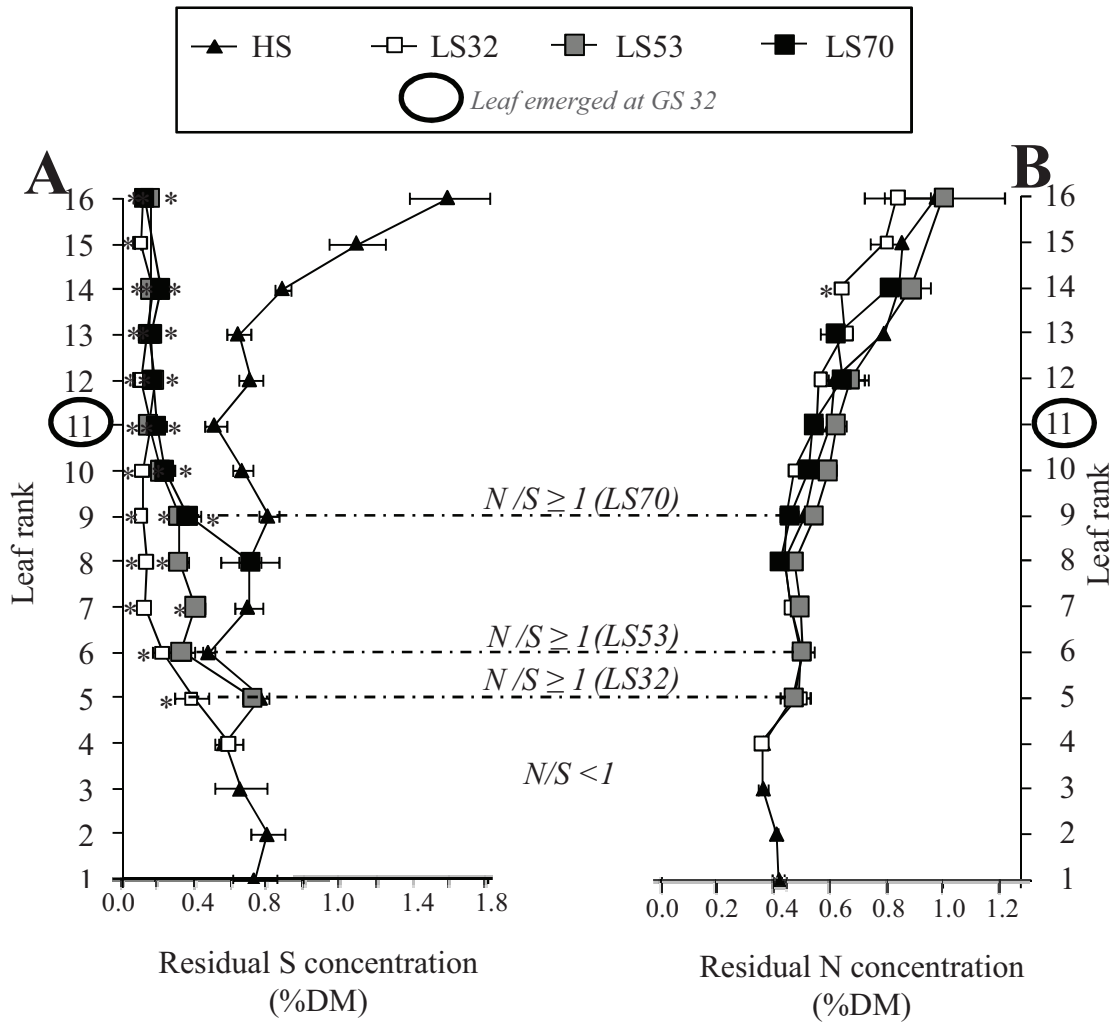
For HS70 plants, little of the S taken up was allocated to the roots: the main sinks for S taken up were floral stems, pod walls and seeds with an equivalent allocation of S to pod



**Figure VI-B-5 :** Flows in percentage of remobilized N (determined on the basis of <sup>15</sup>N enrichment, see Materials and methods for details) and N taken up (estimated from the unlabelled N), and the N amount present at GS 70 and GS 81 in seeds (in mg in seeds), pod walls, floral stems, stems, leaves, and roots of oilseed rape for control plants (HS70, **A**) and N deficient plants (LS70, **B**) during the reproductive stage. Values are given as the mean ± s.e. (n = 16 for the flows, n = 4 for the S amounts in tissues). The thickness of the arrows represents the relative importance of each flow to or from a tissue related to the N taken up or N remobilized, and asterisks indicate that mean values are significantly different from control (p < 0.05).

walls and seeds (Figure VI-B-4A). Leaves were the major source organ for remobilized S ( $60 \pm 2.2\%$  of the total S remobilized from GS 70 to GS 81; Figure VI-B-4A) while stems, floral stems and roots contributed poorly to the supply of endogenous S to other tissues in control plants. The restriction of S availability (LS70 treatment) greatly reduced total S uptake to a level that was insignificant whereas  $67 \pm 2.2$  mg of S were taken up in HS70 conditions (Figure VI-B-4B). Compared to HS70, LS70 conditions also changed the source/sink relationships for endogenous S (Figure VI-B-4B). The LS70 treatment increased the S remobilization efficiency (SRE) (*i.e.* the proportion of the total S amount remobilized into the plant which was recycled towards seeds) with a redistribution of  $65 \pm 1.2\%$  of S remobilized to seeds *versus*  $44 \pm 0.9\%$  in HS70 (Figures VI-B-4B and A). Compared with HS70, the highest mobilization of S for seed filling observed in LS70 conditions would be related to a lower loss of S by fallen leaves (which was about 2-fold inferior in LS70 than in HS70 conditions, Figure VI-B-4). Finally, the S amount quantified in seeds reached  $41 \pm 2.3$  mg in LS70 thanks to remobilization from vegetative plant parts. The source status of roots was significantly lower in LS70 than in control ( $7 \pm 0.1\%$  in LS70 *versus*  $13 \pm 0.3\%$  of total endogenous S recycled in HS70 plants, Figures VI-B-4B and A).

The restriction of S availability applied at GS 70 did not significantly reduced the total N uptake between GS 70 and GS 81 (with an average of  $297 \pm 10$  mg of N taken up) and did not change drastically the N partitioning within the different plant tissues (Figures VI-B-5A and B). The N remobilization efficiency (NRE) to seeds in LS70 conditions reached 77% and was not significantly different from the control (Figures VI-B-5A and B). Finally, about a half of the total N in seeds at GS 81 was derived from mobilization in both treatments. It appeared that leaves represented the major source organ for N, to the main benefit of the seeds, and to a lesser extent to the pod walls. The residual N lost by fallen leaves ( $14 \pm 2.1$  mg of N) was unchanged by the treatment restricting S availability. Compared with control, the N remobilization from roots towards reproductive tissues was reduced in LS70 ( $5.2 \pm 0.1\%$  in LS70 *versus*  $9.6 \pm 0.3\%$  of total endogenous N recycled in HS70 plants; Figures VI-B-4B and A). Whatever the treatment, and as also observed for S, roots therefore contributed poorly to the supply of endogenous N to other plant tissues.



**Figure VI-B-6 :** Residual S (A) and N (B) concentrations of fallen leaves in oilseed rape grown under a high level of sulphate (HS) or under a low level of sulphate (LS32, LS53, LS70). Horizontal bars indicate  $\pm$  s.e. of the mean ( $n=8$ ) when larger than the symbol. Asterisks indicate that mean values are significantly different from control ( $p < 0.05$ ). The intersection points between S and N concentrations were illustrated for each treatment by dotted lines corresponding to the transition between  $N/S < 1$  and  $N/S > 1$ .

### III.6 Effects of different sulphate availabilities on residual S and N concentrations in leaves

Since the residual DM of each leaf rank was not affected by LS treatments, the S and N concentration in fallen leaves in response to the treatments was examined in relation to their nodal positions (Figure VI-B-6A and B). Based on the profile of S concentrations in fallen leaves of HS, it was possible to distinguish two clusters of leaves in concordance with their nodal positions (Figure VI-B-6A). Indeed, the average of residual S in leaf ranks below the nodal position #13 was  $0.67 \pm 0.03\%$  of DM while the residual S concentration was higher than 0.8% of DM in upper leaf ranks (ranging from  $0.88 \pm 0.05\%$  of DM in leaf rank #14 to  $1.78 \pm 0.22\%$  of DM in leaf rank #16). These upper leaves corresponded to the smallest leaves (with a leaf area smaller than  $6 \text{ cm}^2$ , data not shown) that appeared at the visible bud stage. As expected, in response to mineral S restriction treatments, the residual S concentration in leaves was significantly reduced. The S concentration in fallen leaves of LS32 plants was significantly affected from node #5 while this decrease happened in leaves above node #7 for LS53 and above node #9 for LS70 plants (Figure VI-B-6A). Minimal values of residual S concentration in fallen leaves (comprised between 0.1 and 0.2% of DM) were observed in response to the three LS treatments, particularly in leaves above leaf #11 (emerged at GS 32). These minimal foliar S concentrations were observed earlier for the LS32 treatment (from node #7).

In comparison with control, and with the exception of leaf rank #14 (with a concentration of N significantly reduced in response to the LS32 treatment Figure-VI-B-6B), the residual N concentration in leaves was not affected by sulphate restriction treatments. Residual N gradually increased from basal to upper leaves and was globally below 1% of DM (Figure VI-B-6B). While the residual S concentration in the control was higher than the residual N concentration in leaves emerged before the 11<sup>th</sup> rank (emerged at GS 32), it is interesting that crosstalk between S and N concentrations (corresponding to a N/S ratio =1) was observed in lower leaf ranks in response to LS treatments (Figure VI-B-6). The residual N concentration was higher than S concentration for leaf ranks  $\geq$  #5 for LS32, for leaf ranks  $\geq$  #6 for LS53 and for leaf ranks  $\geq$  #9 for LS70 (Figure VI-B-6).



## IV. DISCUSSION

### ***Optimization of SRE is required to maintain NUtE, seed yield and grain quality in response to S restriction***

This double  $^{34}\text{S}$  and  $^{15}\text{N}$  labelling experiment (Figure VI-B-1), undertaken in control conditions, was designed to follow the course of remobilization of endogenous S and N in oilseed rape with a particular attention to leaves that correspond to the main source organs for S and N (Figures VI-B-2 and 3). Except for LS70, the S Harvest Index (SHI) values obtained were noticeably lower than those observed for the N Harvest Index (NHI) (Table VI-B-1), indicating that S is remobilized to seeds less efficiently than N (Sexton *et al.*, 1998). The results obtained for yield and quality of seeds reveal that the mineral S availability between GS 32 and GS 70 would be a determinant for seed filling processes and seed quality. In response to the LS32 treatment, the NHI and N utilization efficiency (NUtE) were reduced and the seed composition was affected (Table VI-B-1). This indicates that an S fertilization regime with the ability to satisfy the growth needs of oilseed rape until GS 53 is required to maintain a sufficient NUtE and protein level in seeds (Fismes *et al.*, 2000). In response to the LS treatment consisting of a restriction of sulphate supply from GS 70 (LS70), oilseed rape was able to optimize its SUE (Table VI-B-2) in order to produce high quality seeds (Table VI-B-1). The LS70 treatment led to the highest S remobilization efficiency (SRE) to seeds with a redistribution of  $65 \pm 1.2$  % of remobilized S towards seeds, in contrast to the  $44 \pm 0.9$  % observed in HS70 (Figures VI-B-4B and A).

The enhanced remobilization of endogenous S towards the seeds observed in response to the LS53 or LS70 treatments was not associated with noticeable modifications of the source / sink relationships for N (Figures VI-B-3B, 3C and 5). It appears that oilseed rape can optimize the mobilization of endogenous S to seeds in response to S restriction, independently of the N distribution.

### ***The efficiency of seed S and N filling is related to S and N remobilization from vegetative aerial organs rather than from root reserves established before GS 70***

About half of the N content in reproductive tissues of oilseed rape was derived from N mobilization (Figure VI-B-5) occurring mostly in leaves and stems (it can reach nearly 75% in field conditions, Malagoli *et al.*, 2005b). The roots did not significantly contribute to endogenous S remobilization. In control plants at GS 81,  $35 \pm 2.4$ % of the total S in roots was

in sulphate form (data not shown). The lack of S remobilization from roots suggests sequestration of sulphate and/or the presence of a high proportion of organic S-reserves that were difficult to mobilize.

Hoefgen and Nikiforova (2008) suggested enhanced lateral root formation thanks to activation of auxin inducible genes as a possible adaptation to prospect for available S in soil in the case of sulphate deficiency. In response to the drastic restriction of mineral S (LS32 treatment), there was a transient and strong increase of S and N demands in roots (increase of sink status until GS 70) and the subsequent  $^{15}\text{N}$  in roots remained high until GS 81 (Figures VI-B-3A). Compared with control, this temporary sink status of roots in response to severe S restriction (LS32) in oilseed rape was also associated with an accumulation of N amount (but not of S) and a higher DM production in roots (data not shown).

These results underline the importance of S mineral availability before flowering and emphasize the level of S reserves in vegetative tissues. It appears that oilseed rape will more efficiently mobilize previously acquired S and N towards the seeds if S was supplied in adequate amounts to support growth of the plant up to the beginning of seed formation. After GS 70, S taken up later (in HS70) was more likely to be disproportionally allocated to the pods (and seeds) (Figure VI-B-4), and was not necessary for the maintenance of seed yield and quality (Table VI-B-1).

### ***Leaves are the major source of endogenous S and N for development of seeds***

The importance of leaves for N storage and mobilization to seeds has been well established (Noquet *et al.*, 2004; Malagoli *et al.*, 2005a) and was verified in our experiment (Figures VI-B-3, 5 and 6). In contrast, the contribution of leaves to S storage and subsequent S distribution to sustain seed formation and filling remains unclear in oilseed rape (Hawkesford and De Kok, 2006). While Sunarpi and Anderson (1997a) reported that soybean leaves contribute little to seed S filling, our work underlined that leaves of oilseed rape would be crucial for their role as a major source organ for S in response to S restriction (Figures VI-B-2 and 3). More specifically, if S limitation occurred at GS 70, leaves may improve their SRE in order to cover the demand of S for seed growth (Figure VI-B-4). Interestingly, despite an enhanced remobilization of foliar S reserves (Figure VI-B-6), the lifespan of the leaves emerging during the whole of the growth cycle was unaltered by the LS treatments (data not shown). Besides, the total N amount in fallen leaves was not significantly different between HS and LS treatments (Figures VI-B-5 and 6B), suggesting that LS conditions improved the S mobilization in leaves independently of N (higher fSRE, Fig. 2 *versus* unaltered fNRE, Fig.

3). To sustain the S demand for growth under S limitation, a strong  $\text{SO}_4^{2-}$  mobilization in leaves was already reported at the rosette stage without any acceleration of leaf senescence (Dubousset *et al.*, 2009).

### ***The mobility of S stored in leaves of oilseed rape depends on mineral S supply***

While the leaves have been shown to be the primary donors of N for mobilization to seeds (Noquet *et al.*, 2004; Malagoli *et al.*, 2005a), we have demonstrated their importance as a major source organ for S as well. In LS70 conditions, leaves supplied the seed with up to  $75 \pm 3.7\%$  of the mobilized S during reproductive development. The present study showed that leaves of control plants had high S concentrations ( $0.67 \pm 0.03\%$  of DM for nodes 1-13) when they abscised, indicating that a significant proportion of leaf S was not mobilized before abscission (as verified in Figure VI-B-2). In absence of deficiency of sulphate, the high proportion of residual S of fallen leaves characterized in controlled conditions (Figure VI-B-6) is in accordance with the potential sequestration of S in leaves (in sulphate form) suggested by previous studies (Blake-Kalff *et al.* 1998; Hawkesford, 2000; Matula and Pechová, 2002). Under restricted sulphate availability, the residual concentration of S in fallen leaves seemed clearly to reflect the balance between supply and demand of S for growth and seed filling. Our experiment suggests that the conjunction of a residual S concentration of 0.1-0.2 % of DM with a value of the N/S ratio  $\geq 1$  in fallen leaves (corresponding to leaves emerged before the bolting stage), could be used as indicators of S deficiency leading to alteration in seed quality (Figure VI-B-6). Nevertheless, the N/S ratio in leaves depends on S and N availability, which leads to difficulties in using this ratio as an accurate diagnosis of the plant S status (Blake-Kalff *et al.*, 2002).

Analysis of the effects of sulphate limitations applied at different growth stages on S and N partitioning reveals disruption between S and N distribution patterns in oilseed rape in response to this nutrient deficiency. By using stable isotopes ( $^{34}\text{S}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) as a tracer system (Monaghan *et al.*, 1999), the determination of  $^{34}\text{S}/^{15}\text{N}$  partitioning and S/N flows allowed characterization of the contribution of each organ to seed S/N filling. The data obtained in the present work confirms that S is relatively immobile in plants in control (HS) conditions, as the proportion of S redistributed from leaf tissue was considerably smaller than N. Under recommended levels of S fertilization, the loss of S through leaf fall from *Brassica napus* L. cv Capitol in field conditions can reach  $22 \pm 0.7 \text{ kg S}\cdot\text{ha}^{-1}$  (Dubousset, unpublished). This also indicates that S is not recycled during leaf senescence if oilseed rape is grown under optimal S nutrition. Redistribution of S from leaves was dependent on variation in S supply. Whereas

the redistribution of S from roots of S-deficient plants was low, a residual S concentration of 0.1 - 0.2% of DM was observed in leaves submitted to LS treatments. In the case of S restriction perceived since GS 32, the early remobilization of S from leaves provides sufficient S for root, stem and pod growth but the subsequent sink strength of seeds was not supplied adequately by S remobilization. In LS53 conditions, the efficiency of remobilization at the whole plant level was greatly increased but was not enough to maintain seed quality. The HS70 treatment reveals (in comparison with LS70) that the excessive S amount taken up after GS 70 was not necessary for seed yield or quality. In response to LS70 treatments, the highest S remobilization (SRE) to seeds was associated with a high foliar mobilization of S (leaves supplied the seed with about  $75 \pm 3.7\%$  of the SRE between GS 70 and GS 81). The minimal values of S concentration, comprising between 0.1 and 0.2% of DM in fallen leaves, would indicate an enhanced remobilization in response to mineral S restriction. The residual S concentration of leaves that emerged before GS 32 may serve as an indicator of a sufficient S reserve status for reproductive growth if it is above 0.5% of DM. These results should be taken into account for the development of field diagnosis tests to determine whether plants are deficient in mineral S.

**Acknowledgement:** This work was supported by the French National Research Agency (program ANR-COSMOS n°ANR-05-JC05-51097) and by a Ph.D. grant to Mrs Lucie Dubousset from the French Ministry of Research. The authors thank Mrs Nathalie Nesi and Véronique Gautier for their help in seed composition analysis. The authors express thanks to Ms Marie-Paule Bataillé and Mr Raphaël Ségura for their technical help in S and N analyses. We wish to acknowledge Mr Raphaël Ségura, Ms Anne-Françoise Ameline, and Ms Alexandra Girondé for their valuable help in the greenhouse experiment. We also are grateful to Mrs Michelle Coustenoble, Ms Josiane Pichon, Anne-Sophie Desfeux, Josette Bonnefoy, Virginie Séguin, Julie Levallois, Marie-Paule Bataillé, Bénédicte De Loynes d'Estrées, and to Mr Jérôme Dubousset for their casual assistance in harvest process.

# Chapitre VII

---

## **Discussion générale**

## **CHAPITRE VII**

### **DISCUSSION GENERALE**

---

Le colza (*Brassica napus* L.) est une plante particulièrement exigeante en N et en S pour son développement et la production de graines. Le S est un élément indispensable pour la production d'acides aminés soufrés essentiels (cystéine, méthionine) qui donnent aux tourteaux leur valeur alimentaire. Cet élément rentre également dans la composition des glucosinolates, métabolites ayant un rôle de défense dans la plante mais dont les produits de dégradation sont indésirables pour l'alimentation animale. Une fertilisation ajustée est donc nécessaire pour satisfaire les besoins en S, qui détermineront en grande partie le rendement et la qualité des graines.

Le remplacement progressif de l'énergie fossile par le carbone issu de ressources renouvelables est une nécessité soulignée par une directive de l'Union européenne (2003/30/CE). D'ici 2010, l'Europe a pour objectif de remplacer 5,75% de combustibles fossiles par les bio-carburants. Par rapport aux combustibles fossiles, le biodiesel (élaboré à base d'huile végétale) est plus efficace que le bioéthanol (élaboré à partir de blé, betterave ou canne à sucre) en termes de gain énergétique (70% *versus* 55%) et de réduction des émissions de gaz à effet de serre (70% *versus* 60%). Grâce à sa haute teneur en huile (45%), le colza est un excellent candidat pour la production de biodiesel. En raison de l'augmentation de la demande de biodiesel en Europe, la superficie totale cultivée de colza devrait augmenter de 30% d'ici 2012. Pour développer une agriculture durable alliant fort rendement et respect de l'environnement, il sera nécessaire de développer de nouvelles variétés productives tout en essayant d'optimiser l'efficacité d'utilisation des éléments minéraux essentiels à la croissance des plantes (principalement N et S). Améliorer l'EUA et l'EUS constitue également un pré requis à l'expansion de la production des cultures dans les terres à faible disponibilité en

éléments nutritifs. En entraînant une chute des dépôts de S sur les terres agricoles depuis une vingtaine d'années, la baisse des émissions industrielles de polluants soufrés a accru le risque d'épuisement en S des sols (Scherer, 2001) et renforce l'urgence de l'amélioration de l'EUS.

Comme de nombreuses plantes monocarpiques, l'absorption de nutriments et le recyclage des éléments issus des organes sources (en particulier des feuilles sénescentes) sont des déterminants majeurs dans l'élaboration du rendement du colza. Toutefois, bien que cette plante présente des capacités élevées d'absorption du nitrate et du sulfate, elle se distingue par de faibles EUA (Schjoerring *et al.*, 1995) et EUS (McGrath & Zhao, 1996), essentiellement liées à un mauvais recyclage du N et du S endogène (majoritairement d'origine foliaire). D'importants apports de fertilisants soufrés (50 à 80 kg de sulfate par ha et par an) et azotés (150 à 210 kg de N par ha et par an), sont alors nécessaires pour pallier la faible EUS et EUA (CETIOM, 2002). La gestion raisonnée de la fertilisation soufrée et azotée apparaît donc nécessaire afin de limiter les coûts de fertilisation et ses conséquences environnementales.

C'est dans cette perspective de gestion optimale de la fertilisation soufrée et azotée que s'inscrivent les travaux conduits au cours de cette thèse. Afin d'atteindre cet objectif, il est nécessaire, au préalable, d'acquérir une meilleure connaissance de la dynamique de gestion du S et du N du colza soumis à différents niveaux de disponibilité en S et N exogènes.

En vue de déterminer des pistes potentielles d'amélioration de l'EUS chez le colza d'hiver, **l'objectif général de cette thèse était d'étudier les relations sources-puits vis-à-vis du S en caractérisant plus particulièrement les processus impliqués dans la remobilisation du S foliaire vers les tissus reproducteurs ainsi que les effets du niveau de disponibilité en S et N exogènes sur ces processus.**

Deux aspects ont alors été pris en compte :

- Qualitatif, par la détermination des stades phénologiques sensibles à une restriction en S minéral, ainsi que par la caractérisation des organes de stockage en S, de la nature des réserves soufrées, et des processus de remobilisation du S foliaire.
- Quantitatif, par l'estimation de la contribution des réserves soufrées au remplissage des graines chez le colza correctement alimenté ou limité en S.

Ce travail a initialement consisté à tester l'hypothèse d'une séquestration vacuolaire du sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) dans les cellules foliaires chez le colza d'hiver cultivé en conditions non limitantes en S. Nous avons choisi d'étudier de manière intégrée, dans des conditions

agronomiques ou contrôlées, les réponses physiologiques associées à une variation de disponibilités en S et/ou en N minéraux. La gestion du S par la plante a donc pu être appréhendée à différents stades de culture, en parallèle avec la gestion du N dont le métabolisme est étroitement lié à celui du S (cf. chapitre II). Les résultats obtenus au champ et en conditions contrôlées ont permis de confirmer l'hypothèse d'une séquestration vacuolaire du  $\text{SO}_4^{2-}$  énoncée plus haut.

Ainsi, dans la première partie de ce chapitre « Discussion », les principaux résultats concernant les impacts agronomiques d'une disponibilité variable en S et/ou en N minéral pour la culture de colza seront rappelés. Un meilleur vidage des feuilles en S étant observé en réponse à une limitation en S exogène, l'hypothèse d'une modulation possible de l'efficacité de remobilisation du S (ERS) et du N (ERN) vers les graines par la période d'occurrence de la limitation en  $\text{SO}_4^{2-}$  au cours du cycle de développement sera également abordée.

Dans une seconde partie, la discussion portera sur les stratégies d'amélioration possible de l'EUS au regard de nos résultats. Le principal composé soufré mobilisé en réponse à une carence en S étant le  $\text{SO}_4^{2-}$ , sa mobilisation au stade rosette a plus particulièrement été étudiée à l'échelle de la feuille parallèlement à l'expression de transporteurs de  $\text{SO}_4^{2-}$  tonoplastiques (*BnSultr4 ;1* et *BnSultr4 ;2*) en tenant compte de l'âge de la feuille et de la disponibilité en N minéral. La mobilisation du  $\text{SO}_4^{2-}$  vacuolaire et la place de la sénescence foliaire (associée à une mobilisation protéique) dans les processus de remobilisation du S et du N en réponse à une limitation en S seront abordées en troisième partie.

## **I. LES IMPACTS AGRONOMIQUES D'UNE DISPONIBILITE VARIABLE EN S ET/OU EN N MINERAL AU COURS DU CYCLE DE CULTURE DU COLZA D'HIVER**

L'objectif principal de ce travail de thèse était d'étudier le rôle de la disponibilité en S et en N sur la remobilisation du S et du N au sein de la plante. Pour cela nous avons recouru à des analyses d'échantillons issus d'expérimentations réalisées en conditions de plein champ pour lesquelles différents niveaux de fertilisation azotée avaient été testés, ainsi qu'à la mise en œuvre de plusieurs dispositifs expérimentaux en conditions contrôlées destinés à l'étude des effets d'une restriction en S couplée ou non à une limitation en N minéral.



### **I.1 En conditions d'alimentation non limitante en S minéral, et quel que soit le niveau de fertilisation nitrique, le sulfate est fortement séquestré au niveau foliaire**

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse (en conditions naturelles ou contrôlées) a révélé que quel que soit le niveau de fertilisation en N, dès lors que le S du sol n'est pas limitant, les feuilles mortes pouvaient chuter avec des teneurs élevées en S (supérieures à 0,5% de la matière sèche). Avec un retour au sol estimé à  $22 \pm 0.7 \text{ kg S.ha}^{-1}$ , les recommandations de fertilisation systématique des cultures de colza à hauteur de 30 unités de S (équivalente à 75 unités de  $\text{SO}_3$ ) seraient alors excessives. **Les recommandations actuelles en matière de fertilisation soufrée ne favorisent pas une bonne remobilisation du S foliaire pour le remplissage des graines.** En dépit d'un apport en S minéral très largement inférieur à celui du N (avoisinant le ratio  $S_{\text{minéral}}/N_{\text{minéral}}=1/7$ , considérée comme étant la valeur optimale, Janzen & Bettany, 1984 ; Fismes-Bemer, 1998), les teneurs en S résiduel des feuilles mortes peuvent excéder celles du N. Ainsi, les feuilles du haut du couvert peuvent chuter avec 1,2% de S dans la matière sèche contre seulement 0,6% de N.

Pour prévenir les carences des plantes en S, la détermination d'un indice de nutrition soufrée (SNI, S nutrition index) semblable à l'indice de nutrition azotée (NNI, N nutrition index) couramment utilisé, pourrait constituer un outil de diagnostic précis du statut soufré de la plante. La relation allométrique entre la teneur en N et la biomasse des parties aériennes chez le colza (Colnenne *et al.*, 1998) est d'ores et déjà bien documentée et permet d'établir une courbe de dilution du N dite « courbe critique » qui sert de base au calcul du NNI. Le NNI est défini comme étant la division entre la teneur en N mesurée et la teneur critique en N associée à une quantité de matière sèche de parties aériennes produite (Greenwood *et al.*, 1991; Lemaire & Gastal, 1997). Une étude menée en 2007 par Vong *et al.* sur le colza de printemps et l'orge a révélé une relation allométrique entre la teneur en S et la biomasse des parties aériennes en conditions contrôlées. Ces résultats ont alors suggéré la possibilité d'une application agronomique du SNI nécessitant au préalable la caractérisation de courbes de dilution du S en conditions naturelles (afin de déterminer *in fine* la courbe de dilution critique nécessaire au calcul du SNI). **Aucune relation allométrique semblable à celle qui associe teneur en N et biomasse des parties aériennes n'a pu être établie dans notre expérimentation.** Cette absence de dilution du S renforce l'hypothèse d'un maintien voire d'une accumulation du S au sein des parties aériennes et en particulier des feuilles. Nos

résultats montrent une grande variation des teneurs en S foliaire selon l'âge et la position nodale de la feuille considérée. Ceci nous amène à recommander la plus grande prudence quant-à l'utilisation de la concentration en S ou du ratio N/S foliaire comme indicateurs d'une éventuelle déficience en S (y compris pour les feuilles mortes). Le manque de fiabilité de ces indicateurs avait également été soulevé notamment par Janzen & Bettany (1984), McGrath & Zhao (1996), Fismes-Bemer (1998), Blake-Kalff *et al.* (2001) au cours du cycle de développement.

En conditions d'alimentation non limitante en S minéral, et quel que soit le niveau de fertilisation nitrique, le S résiduel dans les feuilles chutées se trouve majoritairement sous la forme  $\text{SO}_4^{2-}$ . Celui-ci représente plus de 59% du S résiduel. Ainsi, **la mauvaise remobilisation du  $\text{SO}_4^{2-}$  foliaire constatée quel que soit le niveau de fertilisation azotée engendre un fort retour au sol de S et constituerait le principal facteur limitant de l'EUS chez le colza d'hiver.**

Les travaux menés par Balint & Rengel en 2009 ont révélé l'existence d'une variabilité génétique de l'EUS soulignant la possibilité d'une optimisation de cette EUS. En outre, certaines études suggèrent qu'une voie d'amélioration potentielle de l'EUS est également envisageable via une optimisation de l'efficacité de remobilisation du  $\text{SO}_4^{2-}$  foliaire notamment en réponse à une restriction en S minéral (Blake-Kalff *et al.*, 1998; Hawkesford, 2000). Toutefois, les effets d'une remobilisation accrue du  $\text{SO}_4^{2-}$  foliaire, en réponse à une baisse de disponibilité en S exogène, sur la production et la qualité de graines en fin de cycle restait à vérifier.

## **I.2 Le rendement et la qualité des graines sont étroitement liés à la disponibilité en S et l'impact d'une restriction en S dépend du stade de développement touché**

### ➤ Rendement et viabilité (vigueur germinative) des graines :

Une restriction en S appliquée dès le début de la montaison (LS32) affecte considérablement le rendement (biomasse des graines par plante) et le nombre de graines viables produites en fin de cycle. Ce traitement augmente la proportion de graines échaudées parmi l'ensemble des graines produites. Parallèlement à cette viabilité amoindrie, la morphologie de certaines de ses graines est affectée (graines plus petite et au tégument moins

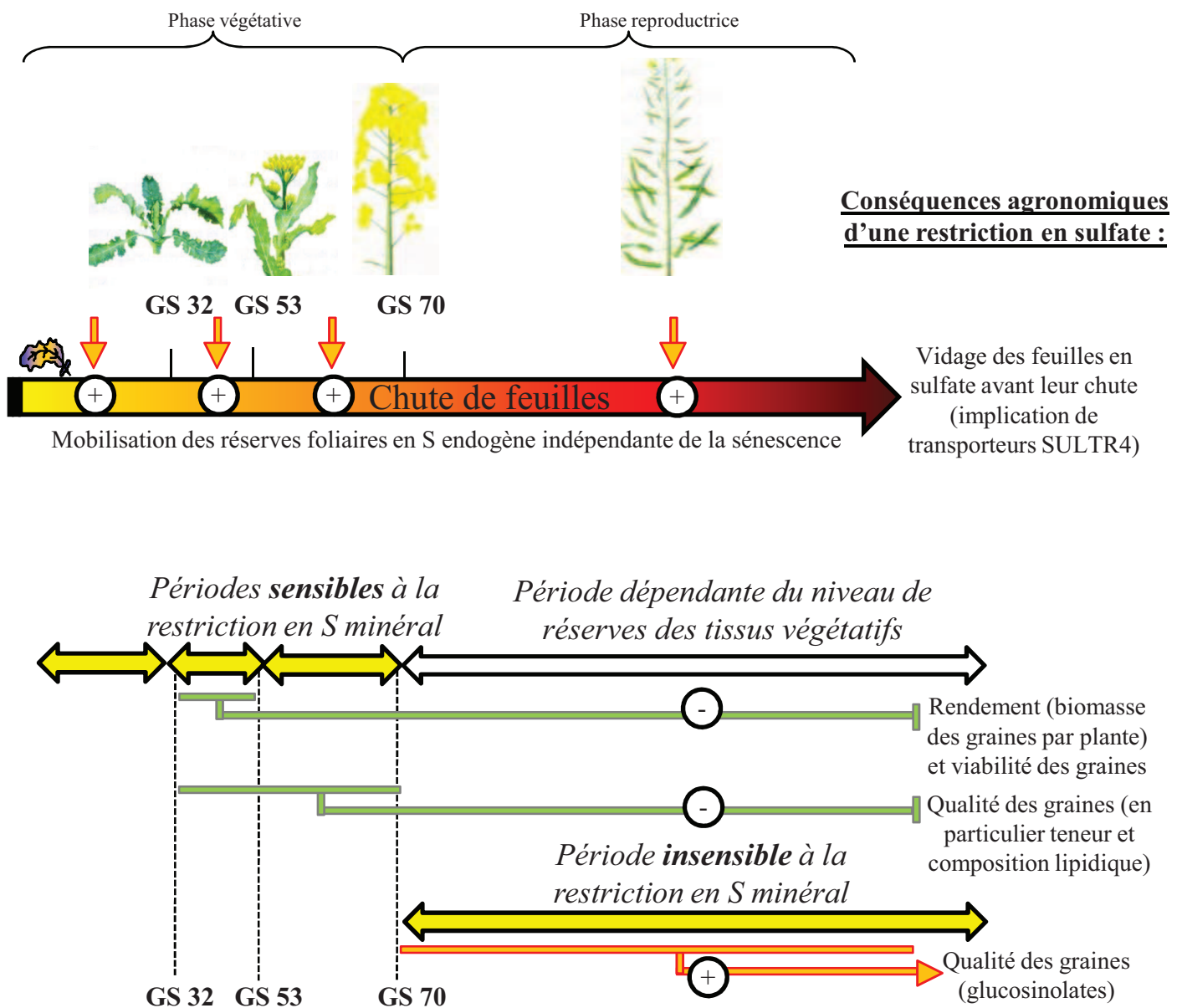
foncé que chez le témoin) en raison d'une maturation inachevée. La mobilisation endogène de S en réponse à ce traitement n'aurait pas suffi à couvrir les besoins des graines pour leur maturation. La quantité finale de S retrouvée dans l'ensemble de ces graines était en effet très faible ( $13.0 \pm 1.2$  mg de S contre  $47.7 \pm 5$  mg chez le témoin). Les conséquences néfastes du traitement LS32 sur le métabolisme de la graine sont associées à un développement de la graine fortement affecté. **Ainsi une fertilisation soufrée en début de montaison serait nécessaire au bon développement de la graine.**

Au cours de la phase de remplissage, le rôle des cotylédons embryonnaires au sein de la graine dans l'assimilation du sulfate a été démontré chez le lupin (Tabé & Droux, 2001). L'assimilation et le transport du sulfate par la graine d'*Arabidopsis* a été récemment étudiée par Zuber *et al.* (2009) et prend place tout au long du développement de la graine. La composition protéique des graines étant également réduite en raison d'une faible quantité de N alloué vers les graines, la synthèse des enzymes de la voie d'assimilation et/ou des protéines de transport (notamment du sulfate) a probablement participé à la chute du métabolisme de la graine en réponse au traitement LS32.

➤ La teneur en glucosinolates des graines :

Les glucosinolates sont des composés azotés, soufrés et carbonés qui peuvent être dégradés par des thioglucosidases (myrosinases) pour libérer du sulfate parallèlement à des composés aux rôles défensifs contre les agents pathogènes ou d'attraction de pollinisateurs (isothiocyanates, thiocyanates, et nitriles). Les glucosinolates représentent moins de 1% du S des feuilles matures de colza (Blake-Kalff *et al.*, 1998) et sont négligeables dans les graines de colza de type 00. Le rôle potentiel de réserve soufrée des glucosinolates au sein de la plante a donc été écarté chez le colza (Fieldsend & Milford, 1994).

Quelle que soit la période d'occurrence d'une limitation en S minéral, il a été observé une baisse significative des teneurs en glucosinolates au sein des graines. Cette diminution est d'autant plus grande que la restriction en S est sévère. **La teneur en glucosinolates au sein des graines est étroitement liée à la disponibilité en S minéral** (Janzen & Bettany, 1984 ; Ahmad *et al.*, 2007). A des niveaux élevés de fertilisation en S, les teneurs en glucosinolates peuvent considérablement augmenter en raison d'une forte disponibilité endogène de méthionine, précurseur de glucosinolates de la famille des alkènes (Zhao *et al.*, 1994 ; Jankowski *et al.*, 2008). L'ensemble de ces résultats est en accord avec la corrélation positive établie en particulier entre la teneur en glucosinolates et la teneur en S des graines (Salac,



**Figure VII-1 :** Schéma récapitulatif des stades de développement du colza les plus sensibles à une restriction en S minéral déterminés selon les conséquences agronomiques des restrictions appliquées après GS 32 (Chapitre VI). La mobilisation des réserves foliaires et l'implication de la sénescence ont été plus particulièrement abordées au stade rosette (Chapitre V). Les effets positifs sont indiqués par les flèches oranges agrémentées d'un signe « + » tandis que les barres vertes agrémentées d'un signe « - » illustrent les conséquences négatives de la restriction en S exogène. Les doubles flèches jaunes représentent l'étendue des périodes de restriction en sulfate testées.

2005) ou encore avec la corrélation négative entre la teneur en glucosinolates et le ratio  $N_{\text{abs}}/S_{\text{abs}}$  (avec  $N_{\text{abs}}$  et  $S_{\text{abs}}$  correspondant aux quantités de N et S totales absorbées par la plante) (Fismes *et al.*, 2000). La balance entre le N et le S disponibles au sein de la plante régule en effet la synthèse d'acides aminés destinés à la production de protéines (métabolites I) et de glucosinolates (métabolites II), dérivés d'acides aminés.

➤ La teneur en protéines et en acides gras des graines :

La restriction en S appliquée au stade GS 70 (-S70) n'a pas altéré la qualité des graines. En revanche, une restriction en S minéral appliquée en début de montaison (LS32) affecte grandement les teneurs en protéines et en huile ainsi que la composition en acides gras des graines, confirmant ainsi les résultats rapportés par d'autres auteurs (McGrath & Zhao, 1996 ; Ahmad & Abdin, 2000a ; Scherer, 2001). Aussi, notre étude a montré que **le niveau d'altération de la teneur en protéines et en huile dépendait de la période d'occurrence de la limitation en S exogène**. Le traitement LS53 (restriction en S appliquée au stade de boutons floraux visibles) n'a eu d'effet significatif que sur la teneur et la composition en acides gras. Les teneurs par exemple en acides gras de type oméga 3 et 6 (linoléique et linolénique) étaient significativement réduites. Néanmoins, contrairement à la composition en acides gras révélée par Ahmad & Abdin (2000a) chez d'autres brassicacées en situation de restriction en S, la proportion des acides oléiques et linoléiques au sein de l'ensemble des acides gras retrouvés dans la graine n'a pas été affectée par les différents traitements testés. **Les effets négatifs en terme de qualité des graines engendrés par des baisses de disponibilité en S minéral avant le stade de croissance GS 70 renforce l'intérêt d'une prise en compte du niveau de disponibilité en S du sol avant ce stade pour maintenir la qualité des graines de colza.**

### **I.3 L'efficience de remobilisation du S et du N (principalement foliaire) varie selon la période d'occurrence de la limitation en $\text{SO}_4^{2-}$ au cours du cycle de développement**

Le dispositif expérimental développé en conditions contrôlées visant à étudier les effets d'une forte restriction en S appliquée à différents stades de développement sur le rendement et la qualité des graines en fin de cycle a révélé la sensibilité du colza à une disponibilité variable en S minéral du substrat (Figure VII-1).

**Le début de la montaison (GS 32) est le stade de développement le plus sensible à la limitation en S. En effet, en réponse au traitement LS 32, la baisse du rendement (biomasse de l'ensemble des graines réduite de 45% par rapport au témoin), l'altération de la viabilité (15,3 ±1,6 % de graines viables parmi l'ensemble des graines produites) et de la qualité des graines de colza (baisse significative des teneurs en protéines et en huile des graines avec une composition lipidique également affectée) sont observées parallèlement à une forte modification de l'EUA et de l'EUS.** La baisse de l'EUA observée en réponse à une restriction en S appliquée au stade GS 32 (LS32) est due à une efficacité de remobilisation du N (ERN) insuffisante associée également à une baisse de l'absorption du N en dépit d'une disponibilité suffisante en cet élément. Cet effet négatif d'une déficience en S sur l'EUA est en accord avec les travaux de Schnug *et al.* (1993) et de Fismes *et al.* (2000) et souligne les fortes interactions entre ces 2 éléments.

Le dispositif de double marquage  $^{34}\text{S}$  /  $^{15}\text{N}$  (avec des périodes de chasse débutant au moment de l'application de disponibilités variables du S minéral) a permis de préciser la dynamique de répartition des réserves soufrées et azotées au sein de la plante en réponse à la restriction en S minéral. En réponse à une restriction en S appliquée au début de la formation des graines (LS70), le colza augmente son ERS qui atteint 65 ±1,2 % du S endogène remobilisé vers les graines contre 44 ±0,9 % chez les plantes témoins. Cette forte efficacité de remobilisation s'explique majoritairement par une mobilisation foliaire et s'est avérée suffisamment efficace pour compenser la faible disponibilité en S minéral après le stade GS 70 et pour maintenir le rendement et la qualité protéique et lipidique des graines. Ainsi, **la détermination du stade de développement le plus sensible (GS 32) à une carence en S pour la production des graines a révélé l'importance des réserves soufrées accumulées au sein des feuilles apparues au cours du développement végétatif pour pallier une baisse ultérieure de disponibilité en S minéral.**

## II. UNE FERTILISATION SOUFREE AJUSTEE : UNE STRATEGIE D'AMELIORATION DE L'EUS A PRIVILEGIER

L'efficacité de la fertilisation soufrée sur la production de colza dépend de la date d'application de l'engrais soufré, de la forme d'apport choisie, et des réserves disponibles du sol. La nature du sol et les conditions météorologiques sont également à prendre en considération pour une fertilisation raisonnée (Goujard, 2007, Comifer). Un apport de sulfate au cours de la montaison rétablit dans une large mesure le rendement grainier tandis que son application au début de la floraison ne compense que modérément les dommages dus à une carence en S (Malhi *et al.*, 2004). Ce constat agronomique concorde avec la sensibilité du colza à la carence en S caractérisée avant le stade GS 70 dans notre expérimentation (Figure VII-1) et souligne l'importance du stade végétatif dans l'EUS par la plante et en particulier dans la capacité de mise en réserve du S.

Au stade rosette, l'EUS de plantes soumises à une limitation en S est meilleure qu'en situation de forte fertilisation. En effet, dans nos conditions expérimentales, le rapport entre la biomasse aérienne et la quantité de S retrouvée dans les parties aériennes chez les plantes limitées en S (LS-HN) était trois fois supérieur à celui des plantes bien alimentées en S (HS-HN) après 28 jours de traitement. Néanmoins une forte EUS caractérisée au stade végétatif n'est pas nécessairement associée à une forte EUS au stade reproducteur (Balint & Rengel, 2009).

L'EUS au stade reproducteur est quant-à elle caractérisable notamment par les composantes de rendements (Balint & Rengel, 2009) : production de graines relative à la quantité de S présente dans les parties aériennes, indice de récolte en S, et teneurs en huile et en protéines des graines. Les travaux menés par Balint & Rengel en 2009 ayant révélé une variabilité génétique de l'EUS, une optimisation de cette EUS par amélioration variétale est donc possible. Parmi les différentes stratégies énoncées dans l'analyse bibliographique (chapitre II), une amélioration de l'acquisition du S pour amplifier les réserves soufrées disponibles au sein de la plante était évoquée. Aussi, une remobilisation efficace des réserves S des organes sources vers les organes puits constitue une autre voie d'amélioration potentielle de l'EUS.

➤ Stratégies d'acquisition du S :

L'acquisition du S se faisant majoritairement au niveau racinaire, l'analyse de l'expression des transporteurs de  $\text{SO}_4^{2-}$  impliqués dans l'absorption racinaire a été réalisée au stade rosette (chapitre IV). **L'expression de *BnSultr1;1* et de *BnSultr1;2* est augmentée au sein des racines en réponse à la restriction en S.** Ainsi, en cas de disponibilité rétablie en  $\text{SO}_4^{2-}$ , la capacité d'absorption peut être accrue (Koralewska *et al.*, 2009) et pourrait permettre transitoirement une nouvelle mise en réserve du  $\text{SO}_4^{2-}$  au sein de la plante. Les deux transporteurs à haute affinité *Sultr1;1* et *Sultr1;2* sont les plus fortement impliqués dans l'absorption du  $\text{SO}_4^{2-}$  par les racines (Buchner *et al.*, 2004; Parmar *et al.*, 2007; Barberon *et al.*, 2008), et dépendent de boucles de régulation complexes et indépendantes (Rouached *et al.*, 2008). L'augmentation d'expression de *Sultr1;1* et de *Sultr1;2* normalement constatée dans le cas d'une limitation uniquement en  $\text{SO}_4^{2-}$  a été retardée (*Sultr1;2*) voire réprimée (*Sultr1;1*) sous l'effet d'une double restriction en S et en N (LS-LN).

La prospection du sol favorisée par une croissance accrue des racines faisait partie des stratégies possibles de réponse à une restriction en S. Le seul traitement présentant cette caractéristique a été le traitement LS32. En effet, **en réponse au traitement LS32, une remobilisation du S et du N transitoirement orientée vers les racines a favorisé la croissance de celles-ci. Les besoins des graines en fin de cycle n'ont cependant pas pu être couverts par remobilisation endogène** (chapitre VI).

Les feuilles présentent également une capacité d'acquisition et d'assimilation du S atmosphérique. Pour pallier une baisse de disponibilité en  $\text{SO}_4^{2-}$  au niveau du sol, les plantes peuvent recourir à l'acquisition du S atmosphérique ( $\text{SO}_2$  et  $\text{H}_2\text{S}$ , De Kok, 2005). Une éventuelle assimilation du S atmosphérique par la plante en réponse à une limitation en  $\text{SO}_4^{2-}$  disponible au sol a été prise en considération dans notre étude. **Aucune absorption significative de S atmosphérique par les plantes carencées en  $\text{SO}_4^{2-}$  n'a été détectée au stade rosette.** En effet, à ce stade végétatif, la quantité de S au sein des plantes LS-HN (soumises à un niveau de fertilisation en  $\text{SO}_4^{2-}$  de 15  $\mu\text{M}$  pendant 28 jours, chapitre IV) n'a pas significativement augmentée au cours de l'expérience. Pour tester cette hypothèse de compensation par l'assimilation du S atmosphérique au stade reproducteur, un traitement de privation totale en  $\text{SO}_4^{2-}$  (-S70) a été appliqué au stade GS 70 (chapitre VI). La quantité de S totale des plantes soumises au traitement LS70 ou -S70 n'ayant pas significativement augmentée au cours de la phase de remplissage des graines, **l'hypothèse d'une acquisition**



**compensatrice du S atmosphérique au stade reproducteur a été écartée.** En outre, comparativement au traitement LS70 la répartition du S intra-plante a été modifiée en faveur des graines en réponse au traitement -S70. **La privation totale en  $\text{SO}_4^{2-}$  appliquée au stade GS 70 (-S70) n'engendre donc pas d'acquisition significative du S atmosphérique mais s'accompagne d'une mobilisation accrue du S vers les graines.**

➤ **Stratégies de remobilisation du S :**

En conditions non limitantes en S, une approche ciblée sur les processus de remobilisation inter-organes a révélé que l'efficacité de remobilisation du S (ERS) vers les graines était largement inférieure à celle du N. En réponse à une limitation en S appliquée au stade GS 70 (LS70), près de 75% des besoins en S des graines peuvent être couverts par les feuilles. Comparativement à la situation témoin, l'EUS du colza a donc été fortement augmentée en réponse au traitement LS70 grâce à un accroissement de l'ERS. D'après nos résultats obtenus en serre, **une des voies possibles d'optimisation de l'EUS chez le colza consisterait à :**

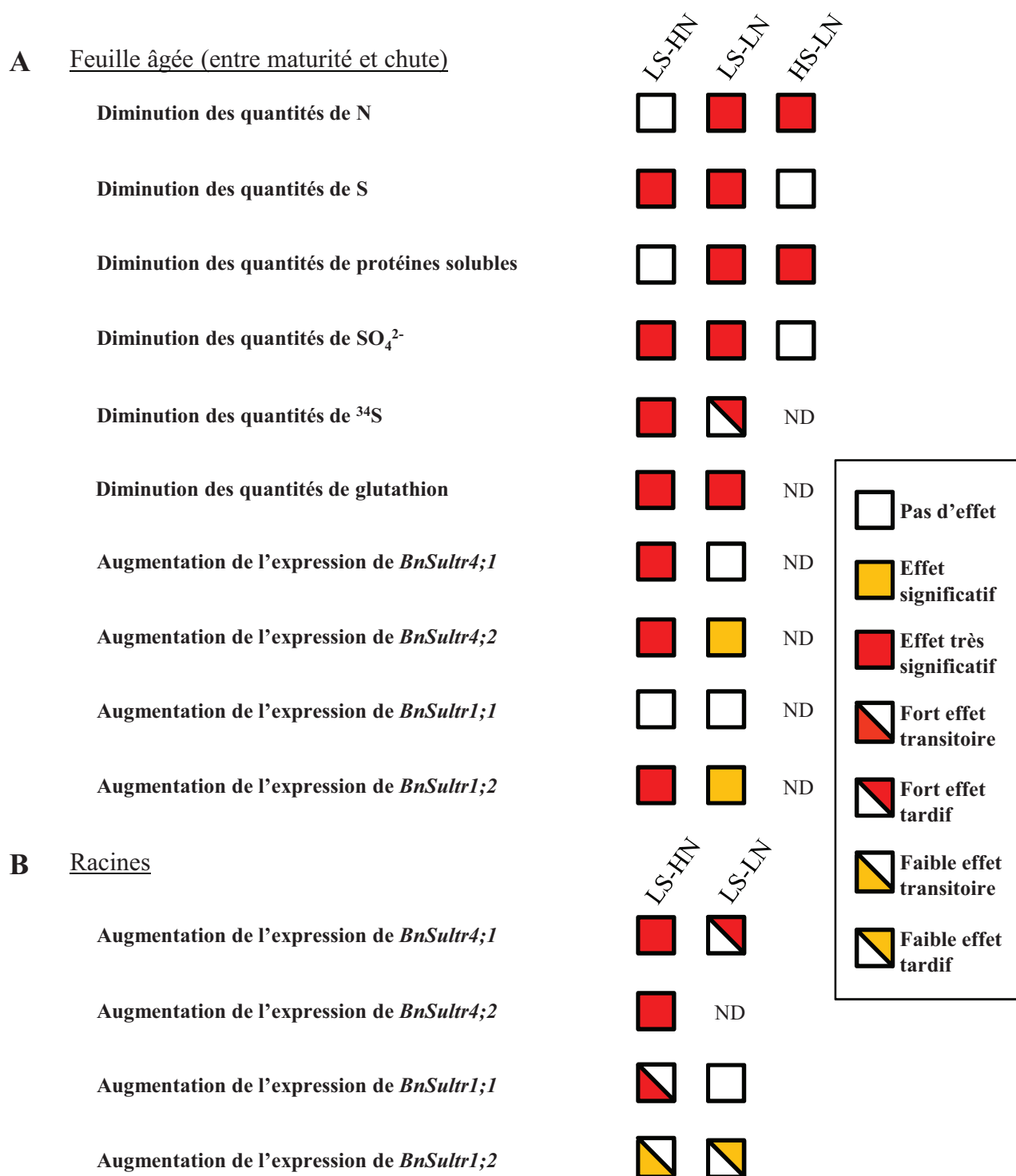
**-favoriser la mise en réserve du  $\text{SO}_4^{2-}$  au sein des feuilles apparues au stade végétatif par une fertilisation précoce en  $\text{SO}_4^{2-}$**  (dès le premier apport d'intrants azotés, et non le deuxième tel qu'actuellement recommandé), puis à :

**- ajuster la fertilisation soufrée afin de favoriser la remobilisation des réserves foliaires vers les graines dès l'apparition de ces nouveaux puits (GS 70).**

### **III. INCIDENCE D'UNE DISPONIBILITE VARIABLE EN S ET/OU EN N MINERAL SUR LE STOCKAGE ET LA MOBILISATION DES RESERVES DE S ET DE N FOLIAIRES**

#### **III.1 La remobilisation du S foliaire peut être particulièrement efficace en réponse à une limitation du S minéral**

L'ensemble de nos résultats obtenus en conditions contrôlées ainsi que les effets agronomiques observés en réponse aux différents traitements testés, a conduit à la détermination d'une fenêtre de développement dite « sensible » (allant du stade GS 32 à GS 70) par opposition à la période dite « insensible » à la restriction en  $\text{SO}_4^{2-}$  (qui s'étend du stade GS 70 à la maturation des graines) (Figure VII-1).



**Figure VII-2:** Diagramme récapitulatif des effets des traitements LS-HN (limitation en S exogène), LS-LN (limitation en S et N exogènes) (Chapitre V), ou HS-LN (limitation en N exogène) (chapitre IV) sur la mobilisation des composés soufrés en comparaison avec la situation témoin (HS-HN, S et N exogènes non limitants) dans une feuille mature avant sa chute et l'expression de transporteurs de sulfate des groupes 4 et 1 (A). Les effets des traitements sur l'expression de transporteurs de sulfate au sein des racines soumises aux traitements LS-HN, LS-LN pendant 28 jours de traitement sont présentés en B. « ND » signifie « Non Déterminé ».

Du stade « rosette » (GS 18) au stade « grains colorés » (GS 81), aucun de nos traitements n'a affecté la croissance totale de la plante. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez *Brassica oleracea* où Koralewska *et al.* (2007) ont également observé un maintien de croissance en dépit de faibles concentrations en  $\text{SO}_4^{2-}$  dans la solution nutritive alors qu'une privation totale en  $\text{SO}_4^{2-}$  se traduit par une réduction significative de la production de biomasse des plantes.

Le maintien de la croissance du colza en dépit de longues périodes de restriction en  $\text{SO}_4^{2-}$  atteste d'une remobilisation du S endogène préalablement stocké dans les organes végétatifs (principalement au sein des feuilles) particulièrement efficace (Abdallah *et al.*, 2009). **En réponse à une limitation du  $\text{SO}_4^{2-}$  du sol, les teneurs résiduelles en S des feuilles peuvent descendre à des valeurs de l'ordre de 0,1-0,2 % de la matière sèche.** Par ailleurs, les traitements de restrictions en  $\text{SO}_4^{2-}$  s'accompagnent d'une mobilisation accrue des réserves foliaires en S endogène indépendante de la sénescence (Figure VII-1). La production de grains qui en résulte n'est cependant pas toujours fructueuse. En effet, à titre d'exemple, une limitation en S minéral au stade début de montaison (traitement LS32) a pour effet d'augmenter la remobilisation foliaire du S sans pour autant aboutir à une optimisation de l'EUS dans la mesure où le S mobilisé n'est pas forcément retrouvé au niveau des grains mais plutôt vers les racines dans un premier temps puis vers les péricarpes dans un second temps (chapitre VI). En revanche, en réponse à une limitation en  $\text{SO}_4^{2-}$  appliquée au stade GS 70, les besoins des grains ont été entièrement couverts par un meilleur vidage des feuilles avant leur chute, conduisant ainsi à une optimisation de l'EUS.

### **III.2 La remobilisation du sulfate au sein de la feuille, un processus complexe dépendant du niveau de disponibilité en N exogène**

En réponse à une restriction du  $\text{SO}_4^{2-}$  disponible dans le sol appliquée au stade rosette, la mobilisation du S endogène (en particulier du  $\text{SO}_4^{2-}$ ) a été étudiée à l'échelle de la feuille (mature ou âgée) en présence ou non d'une fertilisation suffisante en N (LS-HN *versus* LS-LN). La Figure VII-2A résume les effets d'une limitation en S sur les processus impliqués dans la remobilisation du S au sein d'une feuille âgée.

- Au sein d'une feuille âgée de colza placée dans des conditions de fertilisation en S et N favorables (HS-HN), l'expression de *BnSultr4;1* reste faible alors qu'une mobilisation de

réserves soufrées (révélée par marquage  $^{34}\text{S}$ ) a bien lieu en dépit d'un maintien de la quantité de S à des niveaux élevés même quand survient la sénescence.

- Une limitation en S (LS-HN) a induit un processus de mobilisation de  $\text{SO}_4^{2-}$  foliaire associé à une augmentation de l'expression des gènes codant les transporteurs *BnSultr4;1* et *BnSultr4;2*, impliqués dans l'efflux de sulfate vacuolaire (Kataoka *et al.*, 2004) (Figure VII-2A).

- Lorsque la restriction en  $\text{SO}_4^{2-}$  est associée à une faible disponibilité du N minéral (LS-LN), il apparaît (i) une forte remobilisation de sulfate (ii) une expression accrue de *BnSultr4;2*, et (iii) une augmentation de la remobilisation apparente des protéines liée à une accélération de la sénescence (Figure VII-2). Malgré la remobilisation des composés soufrés observée, la croissance des plantes est réduite en réponse au traitement LS-LN.

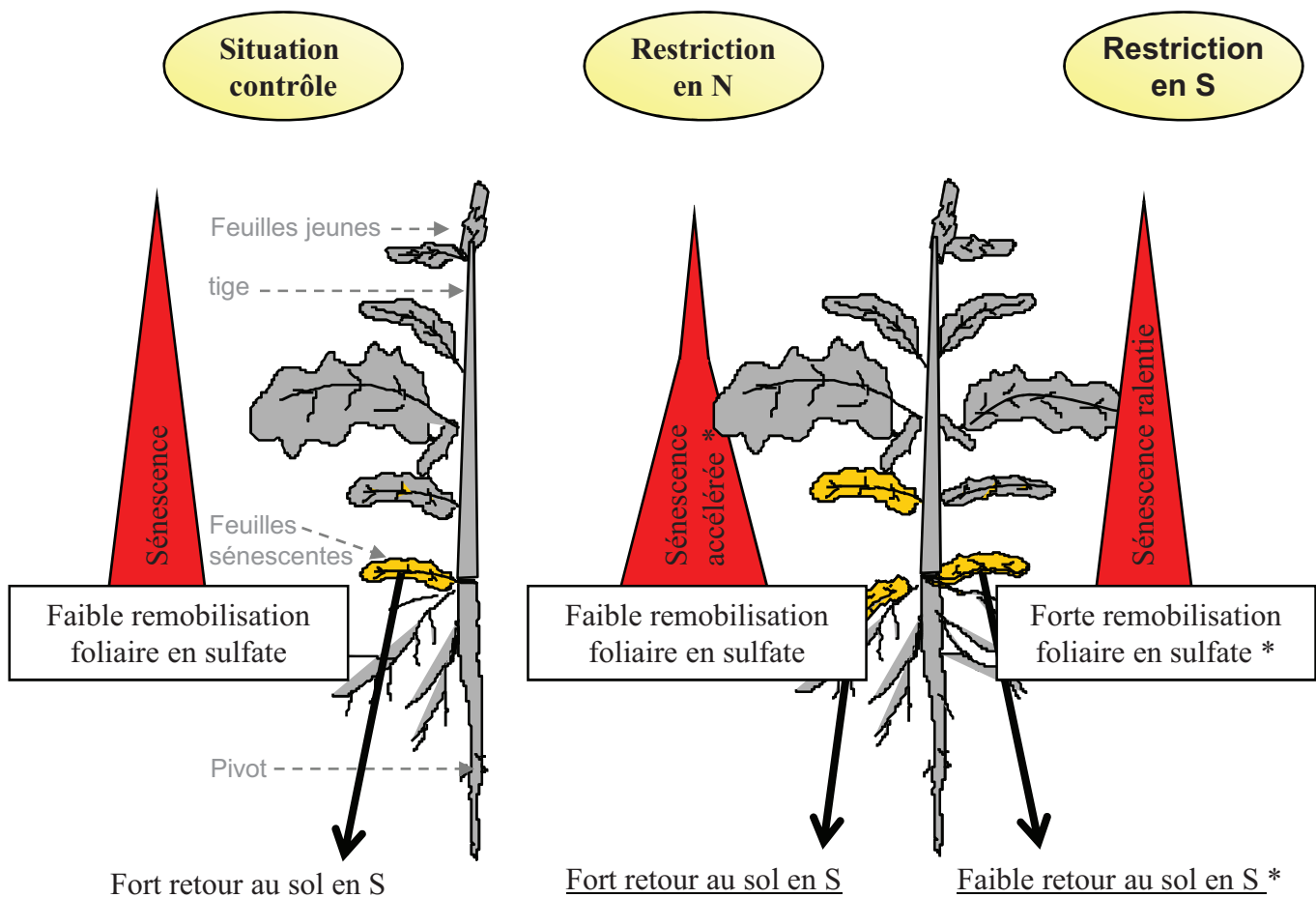
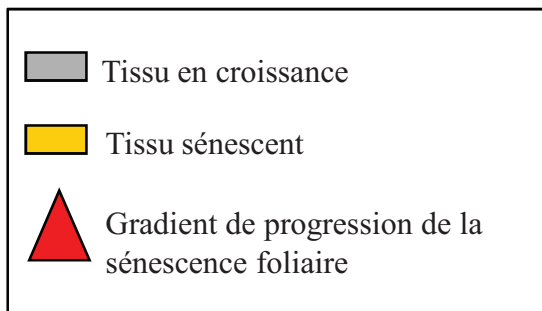
Par rapport au témoin, les quantités de glutathion au sein d'une feuille mature (de l'ordre de 900 à 1000  $\mu\text{g}$ ) sont par ailleurs diminuées de moitié en réponse aux traitements LS-HN et LS-LN (Figure VII-2A).

**Le principal composé soufré mobilisé en réponse à une carence en S est le sulfate. Sa remobilisation est associée à de fortes expressions de transporteurs de sulfate vacuolaire (*BnSultr4;1* et *BnSultr4;2*) dont les profils d'expressions sont également dépendants de la disponibilité en N.** Les processus de recyclage et la nature des composés mobilisés dépendent du niveau de fertilisation azotée. Nos résultats soulignent l'aptitude du colza au stade rosette, à maintenir sa croissance sur une longue durée de restriction en S minéral (28 jours) grâce à des processus de recyclage interne du  $\text{SO}_4^{2-}$  foliaire stocké préalablement au niveau vacuolaire *via* l'induction de transporteurs tonoplastiques. L'expression de transporteurs de  $\text{SO}_4^{2-}$  appartenant à d'autres groupes de transporteurs tels que *BnSultr1;2* (impliqué dans l'absorption) est également sujette à une augmentation significative en réponse aux traitements de restriction en S exogène (Figure VII-2A). En outre, l'induction de l'expression des transporteurs de  $\text{SO}_4^{2-}$  foliaires est généralement atténuée et/ou décalée dans le temps en situation LS-LN par rapport aux plantes LS-HN.

Des observations des processus de mobilisation des réserves soufrées ont également été menées au sein d'une feuille en cours de maturation. Les résultats obtenus ont renforcé l'idée d'une régulation complexe des niveaux d'expression des transporteurs de  $\text{SO}_4^{2-}$  selon l'âge de l'organe (Parmar *et al.*, 2007). En outre, en accord avec la bibliographie, l'expression de

transporteurs de  $\text{SO}_4^{2-}$  (appartenant aux groupes 1 et 4) a également été augmentée au sein des racines de plantes soumises à une restriction en S exogène (Figure VII-2).

Le fait que le colza réponde de manière contrastée à une limitation en S en fonction de la disponibilité en N rappelle l'existence de mécanismes fins de co-régulations entre les métabolismes N et S. L'OAS, par exemple, a été révélée comme étant un régulateur positif de l'expression des gènes codant les transporteurs et les enzymes de l'assimilation du sulfate (Hawkesford, 2000; Leustek *et al.*, 2000). La teneur en OAS au sein des organes végétaux est régie par la nutrition en S et N, elle augmente en situation limitante en S et diminue en situation limitante en N (Kim *et al.*, 1999). Ainsi, l'induction atténuée et/ou décalée dans le temps en situation LS-LN de l'expression des transporteurs de  $\text{SO}_4^{2-}$  par rapport aux plantes LS-HN pourrait être liée au niveau d'OAS endogène.



\*Effets également observés en réponse à la double restriction en N et en S

**Figure VII-3:** Schéma synthétique des effets de restrictions en S et/ou en N exogènes sur la sénescence des feuilles et la remobilisation en sulfate. Ce schéma regroupe l'ensemble des effets observés en conditions naturelles et contrôlées. La vitesse de progression de la sénescence est proportionnelle à l'aire des triangles rouges.

### III.3 Quelle est la contribution de la mobilisation protéique observée au cours de la sénescence dans les mécanismes de remobilisation du S foliaire ?

La disponibilité en S des sols constitue une voie de modulation de l'EUA du colza à prendre en considération. S'il est actuellement acquis qu'une déficience en S peut diminuer significativement l'EUA (Fismes *et al.*, 2000) notamment en réduisant les capacités d'absorption et d'assimilation du nitrate (Kopriva & Rennenberg, 2004), peu de travaux se sont cependant intéressés à ce jour aux impacts d'une limitation en sulfate sur les processus de sénescence foliaire et de mobilisation des composés N et S endogènes associés.

Parmi les réponses possibles à une carence en S, une induction de la sénescence foliaire (Hawkesford & De Kok en 2006) se manifesterait chez les plantes à fleurs lorsque les besoins en S pour les organes en croissance n'ont pu être satisfaits ni par remobilisation endogène ni par absorption de sulfate. Cependant, cette réponse hypothétique déduite d'analyses transcriptomiques et métabolomiques réalisées chez *Arabidopsis* (Nikiforova *et al.*, 2005) n'avait jusqu'à lors pas été vérifiée chez le colza.

Pour répondre à cette question, notre démarche a consisté à étudier l'effet d'une limitation en S exogène sur la vitesse de progression de la sénescence foliaire au stade rosette à l'aide des outils moléculaires *SAG12-Cab* (Gombert *et al.*, 2006 ; chapitre V). **Nos résultats ont non seulement réfuté l'hypothèse d'une accélération de la sénescence mais ont également révélé un retard de la progression spatio-temporelle de ce processus en réponse au traitement LS-HN comparativement au témoin** (Figure VII-3). Ce retard de sénescence observé en réponse à une assimilation limitée en S au stade rosette, pourrait s'expliquer par une baisse de biosynthèse de SAM, nécessaire à la formation d'éthylène, hormone régulant positivement la vitesse de sénescence (Sakai *et al.*, 1998 ; Hesse *et al.*, 2004).

Aucune différence significative n'a par ailleurs été observée sur la durée de vie des feuilles en réponse aux traitements de restriction en S minéral appliqués aux stades de développement ultérieures (GS 32, GS 53, GS 70). Ces derniers traitements ont permis de révéler que **la capacité photosynthétique pouvait être diminuée en réponse à une restriction en S exogène indépendamment du processus de sénescence.**

Afin de vérifier si la limitation de la fertilisation en N (connue pour accélérer la sénescence et augmenter la mobilisation protéique) pouvait favoriser la mobilisation du S foliaire, les teneurs et quantités de S résiduelles ont été étudiées en réponse à différents

niveaux de fertilisation en N au champ et en serre. Les résultats obtenus ont montré que le niveau de fertilisation en N minéral n'avait aucun impact sur les teneurs en S résiduel dans les feuilles mortes. L'effet d'une double restriction en S et en N (LS-LN) sur la sénescence foliaire et la mobilisation en S et en N a également été étudié au stade végétatif. **Ce traitement LS-LN a eu pour effet d'accélérer la vitesse de progression de la sénescence foliaire mais n'a pas significativement augmenté la remobilisation apparente du S par rapport au traitement LS-HN au sein des feuilles et ce, en dépit d'une plus forte mobilisation des composés organiques comportant du N et du S (notamment protéique)** (Figure VII-3). En accord avec les travaux de Blake-Kalff *et al.* (1998), une baisse de disponibilité en S exogène (LS-HN) n'a pas provoqué d'augmentation spécifique de la mobilisation protéique apparente par rapport au témoin (HS-HN) au sein des feuilles de rosette. L'ensemble des effets de disponibilités variables en S et en N sur la sénescence et la mobilisation du sulfate est résumé dans la Figure VII-3.

- Une accélération de la sénescence foliaire (en situation de restriction en N seule HS-LN) n'a pas d'impact significatif sur le vidage des feuilles en S en dépit d'une mobilisation protéique importante.

- L'analyse des processus de mobilisation foliaire du S en situation LS-LN a révélé des augmentations d'expression de transporteurs de  $\text{SO}_4^{2-}$  ainsi qu'une mobilisation tardive mais efficace du  $^{34}\text{S}$  et du  $\text{SO}_4^{2-}$  (comparativement au traitement LS-HN) au sein notamment de la feuille mature (Figures VII-2A et VII-3).

Ces résultats suggèrent que la mobilisation des composés soufrés, et plus particulièrement du  $\text{SO}_4^{2-}$ , est réalisée de manière indépendante de la sénescence.

**Une optimisation des processus de mobilisation du  $\text{SO}_4^{2-}$  foliaire n'a donc été observée qu'en réponse à une restriction en S minéral, suggérant ainsi que le niveau de fertilisation en S a un impact direct sur l'efficacité de mobilisation des composés soufrés foliaires.**

Grâce à la caractérisation des processus de remobilisation du S et du N à l'échelle de la feuille en tenant compte de son stade de développement et de celui de la plante, ce travail de recherche doctoral a permis de progresser de manière significative dans la compréhension des principaux processus impliqués dans la remobilisation des composés soufrés et azotés chez le colza. La synthèse des principaux résultats ainsi que les perspectives qui découlent de cette étude sont plus particulièrement développées dans le chapitre suivant.



# Chapitre VIII

---

## **Conclusion générale et Perspectives**

## **CHAPITRE VIII**

### **CONCLUSION GENERALE et PERSPECTIVES**

---

---

#### **I. CONCLUSION GENERALE**

Pour limiter les conséquences de la carence en S sur le rendement et la qualité grainière du colza, le CETIOM<sup>1</sup> préconise l'utilisation de 30 kg de S par hectare. Toutefois, nos résultats montrent que les feuilles chutées issues de parcelles de colza fertilisées selon ces recommandations peuvent présenter des quantités résiduelles de sulfate élevées (chapitre IV). Ainsi, si cette dose de fertilisant semble correcte pour limiter les effets négatifs de la carence en S sur l'EUA du colza, celle-ci pourrait s'avérer trop élevée pour permettre une efficacité optimale d'utilisation du S (EUS). L'ensemble de nos données suggère qu'un ajustement des niveaux de fertilisation en S minéral serait essentiel afin d'aboutir à la fois à de meilleures EUS et EUA chez le colza en réduisant de manière significative les restitutions en S et N au sol.

Les résultats présentés au sein du chapitre VI ont démontré que le colza pouvait optimiser la mobilisation de ses réserves en S endogène pour les graines en réponse à une limitation modérée du sulfate dans le sol. **La disponibilité en S entre les stades de développement C2 (GS 32) et D2 (GS 53) est déterminante pour le processus de remplissage des graines et la qualité de l'huile produite.** Une restriction sévère à C2 (GS 32) affecte l'EUS et l'EUA. Une approche ciblée sur les processus de remobilisation inter-organes a révélé que l'efficacité de remobilisation du S (ERS) vers les graines était faible en condition de

---

<sup>1</sup> [www.cetiom.fr](http://www.cetiom.fr)

fertilisation non limitante en S. En réponse à une limitation en S appliquée au stade G1 (GS 70) la majeure partie des besoins en S des graines peut être couverte par les feuilles dont l'efficacité de remobilisation (fSRE) est plus que doublée.

**Une des voies possibles d'optimisation de l'EUS chez le colza consisterait alors à augmenter la remobilisation foliaire vers les graines** (avec des teneurs résiduelles en S foliaire pouvant atteindre 0,1-0,2 % de la matière sèche) en ajustant les apports de S minéral.

Ce travail a également permis de montrer que les réserves soufrées accumulées dans les feuilles sous forme de sulfate au cours de la phase de développement végétatif pouvaient suffire à assurer la croissance du colza durant une période de restriction relativement longue. **Ainsi, en conditions d'alimentation soufrée limitante, le sulfate préalablement stocké au niveau vacuolaire est remobilisé de manière efficace vers les tissus en croissance probablement via une induction des transporteurs tonoplastiques (gènes *BnSultr4;1* et *BnSultr4;2*) intervenant dans l'efflux de cet anion (chapitre V).** Contrairement à ce qui se produit lors d'une carence en N, les phénomènes de remobilisation du S des organes sources vers les tissus puits sont réalisés sans accélération de la sénescence ni raccourcissement de la durée de vie des feuilles.

Réalisés à différentes échelles (agronomique, physiologique, biochimique et moléculaire), les travaux rassemblés dans ce manuscrit de thèse ont permis de progresser de manière significative dans l'identification des principaux processus impliqués dans la remobilisation du S chez le colza. Néanmoins, nombreuses interrogations demeurent quant à la compréhension et la régulation de ces processus. Parmi les questions qui sont soulevées, on peut relever les suivantes :

- Les modifications d'efficacité de remobilisation du S observées, en réponse à une restriction en S minéral, au sein des feuilles (fSRE) de la variété de colza Capitot, sont-elles généralisables à d'autres variétés et sont-elles retrouvées en conditions de plein champ ?
- Le sulfate représente la majeure fraction soufrée mobilisable en réponse à une limitation en S. Comment expliquer la sequestration de celui-ci au sein des feuilles de plantes bien alimentées en S ? Quelles sont les formes de transport du S au sein de la plante ? Sont-elles différentes selon la disponibilité en S minéral ?

- La détermination de l'efficacité de remobilisation du sulfate constitue-t-elle un paramètre pertinent de l'EUS ?
- Quels sont les déterminants physiologiques et moléculaires qui interviennent dans un recyclage efficace du sulfate foliaire ?

Ce travail de recherche doctoral ouvre donc de nouvelles perspectives de recherche sur la caractérisation des processus de remobilisation du S foliaire et permet d'envisager de nouvelles pistes d'investigation concernant les possibilités d'amélioration de l'EUS et, par voie de conséquence, de l'EUA.

## II. PERSPECTIVES

Plusieurs perspectives de recherche peuvent être proposées **sur le plan physiologique et moléculaire** associant notamment la fluxomique aux modifications protéomiques caractéristiques d'une carence en S et **sur le plan agronomique** en prolongement direct des conclusions obtenues précédemment.

### II.1 Perspectives sur le plan physiologique et moléculaire

- La recherche de variétés capables de remobiliser fortement le sulfate des parties végétatives au profit des graines permettrait d'ajuster les apports de S par fertilisation. Cette sélection variétale nécessitera au préalable la caractérisation de traits associés à une meilleure efficacité de mobilisation du S.
- Une étude de l'évolution de la répartition précise du S et N au sein des différentes fractions biochimiques d'intérêt, en tenant compte de la composition isotopique après marquage devrait permettre une meilleure compréhension des processus d'adaptation de la plante aux différents niveaux de fertilisations appliqués. En particulier la détermination des formes de transport du S et de la part de  $^{34}\text{S}$  retrouvée en période de chasse au sein de la fraction soufrée que représente le sulfate pourrait permettre une caractérisation plus fine des processus de remobilisation du S soluble au sein de la plante.
- Notre analyse pourrait être élargie à l'étude cinétique du protéome de la feuille de colza afin d'identifier les protéines spécifiquement impliquées dans les phénomènes de remobilisation

du S et permettre une meilleure appréhension des réorientations de voies métaboliques en réponse à une limitation en S.

En effet, l'identification de protéines dont l'expression est modifiée en cas de limitation en S minéral dans des feuilles de colza permettrait d'en apprendre davantage sur les processus d'adaptation de la plante à la restriction en S. Des résultats préliminaires ont été obtenus et sont en cours d'approfondissement au sein du laboratoire. Trente huit spots protéiques modulés par la restriction en S dans une jeune feuille sont en cours de caractérisation, parmi lesquels : une chla/b binding protein putative et la sous-unité ATPase F1 sont par exemple induites par un facteur 3,5 tandis qu'une Homocystéine méthyl transférase putative est réprimée (D'Hooghe, 2009). Il serait intéressant de comparer les protéines impliquées dans la réponse à la restriction en sulfate de feuilles à différents stades de maturation foliaire au stade rosette à celles de feuilles de colza soumis à une limitation en S appliquée à des stades de culture plus avancés (notamment à la montaison). Cette approche devra être conduite en prenant en compte le niveau de N minéral. Par ailleurs, les racines étant l'organe d'absorption du S minéral, et à ce titre le premier à percevoir une restriction en cet élément, il est envisageable que d'importantes modifications du protéome y interviennent.

- Etendre cette approche physiologique et moléculaire à différentes variétés de colza présentant des EUS contrastées pourrait à plus long terme permettre l'accès à une meilleure compréhension des processus liés à une remobilisation efficace du S associée à une utilisation optimale pour la croissance des tissus reproducteurs. Par ailleurs, si des variations de niveaux d'accumulation des protéines précédemment identifiées peuvent être reliées à des variations d'EUS du colza, une approche fonctionnelle *via* des techniques de mutagenèse dirigée ou de génétique inverse (criblage de banque de colza par TILLING) pourrait être envisagée chez le colza afin de confirmer le rôle majeur de ces protéines dans les processus de mobilisation du S conditionnant l'EUS.

## **II.2 Perspectives sur le plan agronomique : quelles pratiques culturales pour demain ?**

Les préconisations de fertilisation actuelles s'élevaient à 30 kg de S par hectare à appliquer au stade D1 (début mars dans le Grand Ouest) (CETIOM<sup>1</sup>). Compte tenu de nos résultats révélant les périodes de sensibilité à la carence en S minéral (comprises entre les stades C2 et G1), la date d'application du fertilisant soufré pourrait être avancée au stade C2. Nos résultats nécessitent toutefois d'être vérifiés chez d'autres variétés et sur différents sites de culture.

Les fortes teneurs résiduelles en S observées au sein de feuilles mortes issues de cultures de colza soumises à cette pratique (chapitre IV) suggèrent que les quantités apportées pourraient alors être réduites et ajustées selon le S résiduel observé au sein des feuilles de rosette.

La qualité des graines de colza en situation de limitation en S minéral appliquée au stade G1 en serre restait pleinement satisfaisante grâce à une ERS (essentiellement foliaire) accrue permettant le remplissage des graines. Après vérification en conditions de plein champ, cette observation pourrait permettre d'envisager un changement de pratique culturale en faveur d'une production de colza andainé (fauché). Cette pratique permettrait une accélération de la maturation des graines associée à une meilleure mobilisation du N et du S (provoquée par l'absence de disponibilité exogène) en fin de cycle. Ainsi, un ajustement des niveaux de fertilisation en S minéral couplée à une fauche en fin de cycle pourrait aboutir à la fois à une meilleure EUS et EUA du colza.

---

<sup>1</sup> [www.cetiom.fr](http://www.cetiom.fr)

# Références

---

## REFERENCES

### -A-

- Abdallah M, Dubousset L, Meuriot F, Etienne P, Avice J-C, Ourry A** (2009) Effect of mineral sulphur availability on nitrogen and sulphur uptake and remobilization during the vegetative growth of *Brassica napus* L. *Journal of Experimental Botany* (soumis en octobre 2009).
- Abrol YP & Ahmad A** (2003) Sulphur in plants, Kluwer Academic Publishers, Netherland.
- Ahmad A & Abdin MZ** (2000a) Interactive effect of sulphur and nitrogen on the oil and protein contents and the fatty acid profiles of oil in the seeds of rapeseed (*Brassica campestris* L.) and mustard (*Brassica juncea* L. Czern. and Coss.). *Journal of Agronomy and Crop Science* **185**, 49-54.
- Ahmad A & Abdin MZ** (2000b) Photosynthesis and its related physiological variables in the leaves of *Brassica* genotypes as influenced by sulphur fertilization. *Physiologia plantarum* **110**, 144-149.
- Ahmad G, Jan A, Arif M, Jan MT, Khattak RA** (2007) Influence of nitrogen and sulfur fertilization on quality of canola (*Brassica napus* L.) under rainfed conditions. *Journal of Zhejiang University Science B* **8**, 731-737.
- Andersen MN, Heidmann T, Plauborg F** (1996) The effect of drought and nitrogen on light interception, growth and yield of winter oilseed rape. *Acta Agricultura Scandinavica Soil and Plant Sciences* **46**, 55-67.
- Anderson JW & Fitzgerald MA** (2001) Physiological and metabolic origin of sulfur for the synthesis of seed storage proteins. *Journal of Plant Physiology* **158**, 447-456.
- 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.
- Avice JC** (1996) Mobilisation des réserves azotées et carbonées chez *Medicago Sativa* L. : étude par marquage <sup>13</sup>C et <sup>15</sup>N, caractérisation des protéines de réserve du pivot et relation avec le potentiel de repousse après une coupe. Thèse de doctorat, Université de Caen, 135p.

### -B-

- Balint T, Rengel Z** (2009) Differential sulphur efficiency in canola genotypes at vegetative and grain maturity stage. *Crop and Pasture Science* **60**, 262-270.



- Barberon M, Berthomieu P, Clairotte M, Shibagaki N, Davidian JC, Gosti F (2008)** Unequal functional redundancy between the two *Arabidopsis thaliana* high-affinity sulphate transporters *SULTR1;1* and *SULTR1;2*. *New phytologist* **180**, 608-619.
- Baxter I, Muthukumar B, Park HC, Buchner P, Lahner B, Danku J, Zhao K, Lee J, Hawkesford MJ, Guerinot ML and Salt DE (2008)** Variation in molybdenum content across broadly distributed populations of *Arabidopsis thaliana* is controlled by a mitochondrial molybdenum transporter (MOT 1). *Public Library of Science Genetics* **4**, e1000004.
- Blake-Kalff MMA, Harrison KR, Hawkesford MJ, Zhao FJ, McGrath SP (1998)** Allocation of sulfur within oilseed rape (*Brassica napus* L.) leaves in response to sulfur-deficiency. *Physiologia Plantarum* **118**, 1337–1344.
- Blake-Kalff MMA, Zhao FJ, Hawkesford MJ, McGrath SP (2001)** Using plant analysis to predict yield losses caused by sulphur deficiency. *Annals of Applied Biology* **138**, 123-127.
- Blake-Kalff MMA, Zhao FJ, McGrath SP (2002)** Sulphur deficiency diagnosis using plant tissue analysis. *Proceeding of the International Fertiliser Society*, 23p.
- Bloem E, Riemenschneider A, Volker J, Papenbrock J, Schmidt A, Salac L, Haneklaus S, Schnug E (2004)** Sulphur supply and infection with *Pyrenopeziza brassicae* influence L-cysteine desulphhydrase activity in *Brassica napus* L. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2305-2312.
- Bolton J, Nowakowski TZ, Lazarus W (1976)** Sulfur-nitrogen interactions effects on the yield and composition on protein-N, non protein-N, and soluble carbone hydrates in perennial ryegrass. *Journal of the science of Food and Agriculture* **27**, 553–560.
- Bradford MM (1976)** A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-54.
- Buchanan-Wollaston V & Ainsworth C (1997)** leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridization. *Plant Molecular Biology* **33**, 821-834.
- Buchner P, Stuiver CE, Westerman S, Wirtz M, Hell R, Hawkesford MJ, De Kok LJ (2004a)** Regulation of sulfate uptake and expression of sulfate transporter genes in *Brassica oleracea* as affected by atmospheric H<sub>2</sub>S and pedospheric sulfate nutrition. *Plant Physiology* **136**, 3396–3408
- Buchner P, Takahashi H, Hawkesford MJ (2004b)** Plant sulphate transporters: co-ordination of uptake, intracellular and long-distance transport. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1765–1773.

## -C-

**CETIOM (2002)** Colza d'hiver : les techniques culturales, le contexte économique. CETIOM Eds. (Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains), Thiverval-Grignon, France.

**Colnenne C, Meynard JM, Reau R, Justes E, Merrien A** (1998) Determination of a critical nitrogen dilution curve for winter oilseed rape. *Annals of Botany* **81**, 311-317.

## -D-

**Dan H, Yang G, Zheng ZL** (2007) A negative regulatory role for auxin in sulphate deficiency response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **63**, 221-235.

**De Kok LJ, Castro A, Durenkamp M, Koralewska A, Posthumus FS, Stuiver CEE, Yang L, Stulen I** (2005) Pathways of plant sulfur uptake and metabolism - an overview. *Landbauforschung Völkenrode*, Special Issue **283**, 5-13.

**Dejoux JF** (1999) Evaluation d'itinéraires techniques du colza d'hiver en semis très précoces. Analyse agronomique, conséquences environnementales et économiques. Thèse de Doctorat, INA Paris-Grignon, France, 244p.

**Desclos M** (2008) Modifications physiologiques et protéomiques associées à la remobilisation de l'azote foliaire au cours de la sénescence foliaire du colza (*Brassica napus* L.). Thèse de doctorat, Université de Caen, 214p.

**Desclos M, Dubousset L, Etienne P, Le Cahérec F, Satoh H, Bonnefoy J, Ourry A, Avice JC** (2008) A Proteomic profiling approach to reveal a novel role of BnD22 (*Brassica napus* drought 22 kD)/Water soluble chlorophyll binding protein in young leaves during nitrogen remobilization induced by stressful conditions. *Plant Physiology* **147**, 1830-1844.

**Desclos M, Etienne P, Coquet L, Cosette P, Bonnefoy J, Segura R, Reze S, Ourry A, Avice J-C** (2009) A combined <sup>15</sup>N tracing / proteomics study in *Brassica napus* reveals the chronology of proteomics events associated to N remobilisation during leaf senescence induced by nitrate limitation or starvation. *Proteomics*, **9**, 3580- 3608.

**D'Hooghe P** (2009) Effets d'une oligotrophisation en S sur la physiologie et le protéome foliaire du colza (*Brassica napus* L.). Master 1<sup>ère</sup> année. Université de Caen, 19p.

**Diaz C, Lemaître T, Christ A, Azzopardi M, Kato Y, Sato F, Morot-Gaudry JF, Le Dily F, Masclaux-Daubresse C** (2008) Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in *Arabidopsis* under low nitrogen nutrition. *Plant Physiology* **147**, 1437-1449.

**Droux M** (2004) Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. *Photosynthesis Research* **79**, 331-348.

**Dubousset L, Abdallah M, Desfeux AS, Etienne P, Meuriot F, Hawkesford MJ, Gombert J, Segura R, Bataille MP, Reze S, Bonnefoy J, Ameline AF, Ourry A, Le Dily F, Avice JC** (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.

**-E-**

- El Kassis E, Cathala N, Rouached H, Fourcroy P, Berthomieu P, Terry N, Davidian JC** (2007) Characterization of a selenate-resistant *Arabidopsis* mutant. Root growth as a potential target for selenate toxicity. *Plant Physiology* **143**, 1231–1241.
- Eriksen J, Murphy MD, Schnug E** (1998) The soil sulphur cycle. Sulphur in agrosystems. In: Schnug E Eds. *Sulphur in agroecosystems*. Kluwer Academic Publishers, 39-73.
- Etienne P, Desclos M, Le Gou L, Bonnefoy J, Simon L, Maurel K, Le Dily F, Ourry A, Avice JC** (2007) N-protein mobilization associated to leaf senescence process of oilseed rape (*Brassica napus* L.) is concomitant with the disappearance of a trypsin inhibitor activity. *Functional Plant Biology* **34**, 895-906.

**-F-**

- Fieldsend J & Milford GFJ** (1994) Changes in glucosinolates during crop development in single- and double-low genotypes of winter oilseed rape (*Brassica napus*): I. Production and distribution in vegetative tissues and developing pods during development and potential role in the recycling of sulphur within the crop. *Annals of Applied Biology* **124**, 531-542.
- Fismes-Bemer J** (1998) Effet de la fertilisation azotée et soufrée et d'un inhibiteur de nitrification (ATS) sur la nutrition azotée et soufrée du colza. Interaction entre l'azote et le soufre, impact sur la qualité et le rendement en graines. Thèse de doctorat, ENSAIA-INPL, Nancy, 166p.
- Fismes J, Vong PC, 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.
- Friedrich JW & Schrader LE** (1978) Sulfur deprivation and nitrogen metabolism in maize seedlings. *Plant Physiology* **61**, 900–903.
- Friedrich CG, Rother D, Bardischewsky F, Quentmeier A, Fischer J** (2001) Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 2873-2882
- Frink CR, Waggoner PE, Ausubel JH** (1999) Nitrogen fertilizer: retrospect and prospect. *Proceedings of the National Academy of sciences* **96**, 1175-1180.

**-G-**

- Gan S & Amasino RM** (1997) Making sense of senescence. Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiology* **113**, 313-319.
- Gilbert S, Clarkson DT, Cambridge M, Lambers H, Hawkesford MJ** (1997) Sulphate-deprivation has an early effect on the content of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and photosynthesis in young leaves of wheat. *Plant Physiology* **115**, 1231–1239.

- Giordano M, Pezzoni V, Hell R** (2000) Strategies for the allocation of resources under sulfur limitation in the green alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiology* **124**, 857–864.
- Giovanelli J, Mudd SH, Datko, AH** (1980) Sulfur amino acids in plants. Miflin, B.J. Eds. In: *The Biochemistry of Plants*. Academic Press, New York, 454–500.
- Giovanelli J** (1990). Regulatory aspects of cysteine and methionine biosynthesis. Rennenberg H, Brunold C, De Kok LJ, Stulen I, Eds. In: *Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants; fundamental, environmental and agricultural aspects*. The Hague: SPB Academic Publishing, 33–48.
- 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.
- Gombert J** (2006) Efficience d'utilisation de l'azote par le colza d'hiver (*Brassica napus* L.) : effet de la fertilisation azotée et variabilité génotypique. Thèse de doctorat, Université de Caen, 114p.
- Goujard O** (2007) Soufre et fertilisation : approche bilancielle, besoins et recommandations. COMIFER (Comité français d'étude et de développement de la fertilisation raisonnée), présentation orale du 13 juin 2007 à l'Académie de l'agriculture française, Paris, France.
- Greenwood DJ, Gastal F, Lemaire G, Draycott A, Millard P, Neeteson JJ** (1991) Growth rate and %N of field-grown crops: theory and experiments. *Annals of Botany* **67**, 181-190.

## -H-

- Hagan ND, Upadhyaya N, Tabe LM, Higgins TJV** (2003) The redistribution of protein sulfur in transgenic rice expressing a gene for a foreign, sulfur-rich protein. *The Plant Journal* **34**, 1-11.
- Haneklaus S & Schnug E** (1994) Diagnosis of crop sulphur status and application of X-ray fluorescence spectroscopy for the sulphur determination in plant and soil materials. *Sulphur in Agriculture* **18**, 31-40.
- Haneklaus S, Brauer A, Bloem E, Schnug E** (2005) Relationship between sulfur deficiency in oilseed rape (*Brassica napus* L.) and its attractiveness for honeybees. *Landbauforschung Völkenrode Special Issue* **283**, 37-43.
- Hawkesford MJ, Davidian JC, Grignon C** (1993) Sulphate/H<sup>+</sup> co-transport in plasma membrane vesicles isolated from *Brassica napus*: increased transport in membranes isolated from sulphur-starved plants. *Planta* **190**, 297–304.
- Hawkesford MJ** (2000) Plant responses to sulphur deficiency and the genetic manipulation of sulphate transporters to improve S-utilization efficiency. *Journal of Experimental Botany* **51**, 131–138.
- Hawkesford MJ** (2003) Transporter gene families in plants: the sulphate transporter gene family - redundancy or specialization? *Physiologia Plantarum* **117**, 155-165.

- Hawkesford MJ, Buchner P, Hopkins L, Howarth JR** (2003) The plant sulphate transporter family: specialized functions and integration with whole plant nutrition. Davidian J-C *et al.*, Eds. In: *Sulphur transport and assimilation in plants*. Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers, 1–9.
- Hawkesford MJ & De Kok LJ** (2006) Managing sulphur metabolism in plants. *Plant, Cell and Environment* **29**, 382-395.
- Hawkesford MJ** (2007) Sulfur and plant ecology: a central role of sulfate transporters for responding to sulfur availability. MJ Hawkesford, LJ De Kok Eds. In: *Sulfur in Plants – An Ecological Perspective*, Springer, Dordrecht 1–15.
- Hesse H & Hoefgen R** (2003) Molecular aspects of methionine biosynthesis. *Trends in Plant Science* **8**, 259–262.
- Hesse H, Nikiforova V, Gakière B, Hoefgen R** (2004) Molecular analysis and control of cysteine biosynthesis: integration of nitrogen and sulphur metabolism. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1283-1292.
- 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. *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**, 10205–10210.
- Hirai MY, Klein M, Fujikawa Y, Yano M, Goodenowe DB, Yamazaki Y, Kanaya S, Nakamura Y, Kitayama M, Suzuki H, Sakurai N, Shibata D, Tokuhisa J, Reichelt M, Gershenzon J, Papenbrock J, Saito K** (2005) Elucidation of Gene-to-Gene and Metabolite-to-Gene networks in *Arabidopsis* by integration of metabolomics and transcriptomics. *The journal of Biological Chemistry* **280**, 25590-25595.
- Hoefgen R & Hesse, H** (2007) Sulfur in plants as part of a metabolic network. Hawkesford MJ, De Kok LJ, Eds. In: *Sulfur in Plants and Ecological Perspective*, vol. 6. Springer Netherlands, 107-142.
- Hoefgen R & Nikiforova VJ** (2008) Metabolomics integrated with transcriptomics: assessing systems response to sulfur-deficiency stress. *Physiologia Plantarum* **132**, 190–198.

**-J-**

- Jackson GD** (2000) Effects of nitrogen and sulfur on canola yield and nutrient uptake. *Agronomy Journal* **92**, 644–649.
- Jankowski K, Bubzyński W, Szymanowski A** (2008) Effect of sulfur on the quality of winter rape seeds. *Journal of Elementology* **13**, 521-534.

**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.

**Justes E, Mary B, Meynard JM, Machet JM, Thelier-Huché L** (1994) Determination of a critical nitrogen dilution curve for winter wheat crops. *Annals of Botany* **74**, 397-407.

## -K-

**Karmoker JL, Clarkson DT, Saker LR, Rooney JM, Purves JV** (1991) Sulphate deprivation depresses the transport of nitrogen to the xylem and the hydraulic conductivity of barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. *Planta* **185**, 269-278.

**Kast D, Stalder M, Rügsegger A, Galli U, Brunold C** (1995) Effect of NO<sub>2</sub> and nitrate on sulfate assimilation in maize. *Journal of Plant Physiology* **147**, 9-14.

**Kataoka T, Watanabe-Takahashi A, Hayashi N, Ohnishi M, Mimura T, Buchner P, Hawkesford MJ, Yamaya T, Takahashi H** (2004) Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**, 2693-2704.

**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.

**Koprivova A, Suter M, Op den Camp R, Brunold C, Kopriva S** (2000) Regulation of sulfate assimilation by nitrogen in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **122**, 737-746.

**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.

**Kopriva S** (2006) Regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis* and beyond. *Annals of Botany* **97**, 479-495.

**Koralewska A, Posthumus FS, Stuiver CEE, Buchner P, Hawkesford MJ, De Kok LJ** (2007) The characteristic high sulfate content in *Brassica oleracea* is controlled by the expression and the activity of sulfate transporter. *Plant Biology* **9**, 654-661.

**Koralewska A, Buchner P, Stuiver CEE, Posthumus FS, Kopriva S, Hawkesford MJ, De Kok LJ** (2009) Expression and activity of sulfate transporters and APS reductase in curly kale in response to sulfate deprivation and re-supply. *Journal of Plant Physiology* **166**, 168-179.

**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.

**-L-**

- Lemaire G & Gastal A** (1997) N uptake and distribution in plant canopies. G Lemaire. Eds. In: *Diagnosis of the Nitrogen Status in Crops*. Springer-Verlag, Berlin, 3-43.
- Leterme P** (1988) Modélisation du fonctionnement du peuplement de colza d'hiver en fin de cycle : élaboration des composantes finales du rendement. CETIOM-INRA Eds. In *Physiologie et élaboration du rendement du colza*. Paris. 124-129.
- Leustek T & Saito K** (1999) Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiology* **120**, 637–644.
- Leustek T, Martin MN, Bick JA, Davies JP** (2000) Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 141–165.
- Lewandowska M & Sirko A** (2008). Recent advances in understanding plant response to sulfur-deficiency stress. *Acta Biochimica Polonica* **55**, 467-471.
- Lim PO, Kim HJ, Nam HG** (2007) Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 115-136.
- Livak J & Schmittgen T** (2001) Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* **25**, 402–408.

**-M-**

- Malagoli P, Laîné P, Le Deunff E, Rossato L, Ney B, Ourry A.** (2004) Modeling N uptake in *Brassica napus* L. 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, Laîné P, Rossato L, Ourry A.** (2005a) Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to harvest I. Global N flows between vegetative and reproductive tissues in relation to leaf fall and their residual N. *Annals of Botany* **95**, 853-861.
- Malagoli P, Laîné P, Rossato L, Ourry A.** (2005b) Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to harvest. II. an  $^{15}\text{N}$ -labelling-based simulation model of N partitioning between vegetative and reproductive tissues. *Annals of Botany* **95**, 1187-1198.
- Malhi SS, Schoenau JJ, Grant CA** (2004) A review of sulphur fertilizer management for optimum yield and quality of canola in the Canadian great plains. *Canadian Journal of Plant Science* **85**, 297-307.
- Malhi SS, Gan Y, Raney JP** (2007) Yield, seed quality, and sulfur uptake of *Brassica* oilseed crops in response to sulfur fertilization. *Agronomy Journal* **99**, 570-577.

- Marino MA, Mazzanti A, Assuero SG, Gastal F, Echeverria HE, Andrade F** (2004) Nitrogen dilution curves and nitrogen use efficiency during winter–spring growth of annual ryegrass. *Agronomy journal* **96**, 601–607.
- Maruyama-Nakashita A, Inoue E, Watanabe-Takahashi A, Yarnaya T, Takahashi H** (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 Preview*.
- Massonneau A, Cathala N, Grignon C, Davidian JC** (1997) Effect of sulphate deficiency on the plasma membrane polypeptide composition of *Brassica napus*. *Journal of Experimental Botany* **48**, 93–100.
- Matula J & Pechová M** (2002) Sulfur and sulfate concentrations in leaves of oilseed rape under field conditions. *Rostlinná Výroba* **48**, 433–440.
- May MJ, Vernoux T, Leaver C, Montagu MV, Inze D** (1998) Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany* **49**, 649–667.
- McGrath SP & Zhao FJ** (1996) Sulphur uptake, yield response and the interactions between N and S in winter oilseed rape (*Brassica napus*). *Journal of Agricultural Science*, **126**, 53–62.
- McGrath SP, Zhao FJ, Withers PJA** (1996) Development of sulphur deficiency in crops and its treatment., The Fertiliser Society Eds. In: *Proceedings of the Fertiliser Society*, No. 379. Peterborough.
- McNeill AM, Eriksen J, Bergström L, Smith KA, Marstorp H, Kirchmann H, Nilsson I** (2005) Nitrogen and sulphur management: challenges for organic sources in temperate agricultural systems. *Soil Use and Management* **21**, 82–93.
- Mendham NJ & Salisbury PA** (1995) Physiology: Crop development, growth and yield. Kimber DS and McGregor DI Eds. In: *Brassica oilseeds: production and utilization*, Wallingford, CAB. 11–64.
- Merrien A & Pouzet A** (1988) Principaux facteurs limitant les rendements du colza d'hiver dans les conditions françaises, Physiologie et élaboration du rendement du colza d'hiver, CETIOM-INRA Eds. Paris, 16–19.
- Merrien A, Pouzet A, Grandin L, Maisonneuve C, Nesme D** (1989) Cahier technique Colza. CETIOM Eds. Paris, 56 p.
- Migge A, Bork C, Hell R, Becker TW** (2000) Negative regulation of nitrate reductase gene expression by glutamine or asparagine accumulating in leaves of sulphur-deprived tobacco. *Planta* **211**, 587–595.



**Monaghan JM, Scrimgeour CM, Stein WM, Zhao FJ, Evans EJ** (1999) Sulphur accumulation and redistribution in wheat (*Triticum aestivum*): a study using stable sulphur isotope ratios as a tracer system. *Plant, Cell and Environment* **22**, 831-839.

**Monje O & Bugbee B** (1992) Inherent limitations of nondestructive chlorophyll meters: a comparison of two types of meters. *Hortscience* **27**, 69-71.

**Murphy MD, Quirke WA** (1997) The effect of sulphur/nitrogen/selenium interactions on herbage yield and quality. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* **36**, 31-38.

-N-

**Naeve SL & Shibles RM** (2005) Distribution and mobilization of sulfur during soybean reproduction. *Crop Science Society of America* **45**, 2540-2251.

**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.

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

**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. *Plant Journal* **33**, 633-650.

**Nikiforova V J, Gakière B, Kempa S, Adamik M, Willmitzer L, Hesse H, Hoefgen R** (2004) Towards dissecting nutrient metabolism in plants: a systems biology case study on sulphur metabolism. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1861-1870.

**Nikiforova VJ, Kopka J, Tolstikov V, Fiehn O, Hopkins L, Hawkesford MJ, Hesse H, Hoefgen R** (2005) Systems rebalancing of metabolism in response to sulfur deprivation, as revealed by metabolome analysis of *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology* **138**, 304-318.

**Nikiforova VJ, Bielecka M, Gakière B, Krueger S, Rinder J, Kempa S, Morcuende R, Scheible WR, Hesse H, Hoefgen R** (2006) Effect of sulfur availability on the integrity of amino acid biosynthesis in plants. *Amino Acids* **30**, 173-183.

**Niknahad-Gharmakher H** (2008) Minéralisation du soufre associée à la décomposition des matières organiques dans les sols et relations avec les dynamiques du carbone et de l'azote. Thèse de Doctorat, Agro Paris Tech, 145p.

**Noodén LD, Guiamét JJ, John, I** (1997) Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum* **101**, 746-753.

**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.

**-P-**

- 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* (Stuttgart) **9**, 647-53.
- Plénet D, Lemaire G** (2000) Relationships between dynamics of nitrogen uptake and dry matter accumulation in maize crops. Determination of critical N concentration. *Plant and Soil* **216**, 65-82.
- Postma R, Van Erp PJ, Saanen R** (1999) Quantifying the sulphur supply to agricultural crops. Abrol YP & Ahmad A Eds. In: *Sulphur in plants*, 60-61.
- Prosser IM, Schneider A, Hawkesford MJ, Clarkson DT** (1997) Changes in nutrient composition, metabolite concentrations and enzyme activities in spinach in the early stages of S-deprivation. Cram WJ, De Kok LJ, Stulen I, Brunold C, Rennenberg, H, Eds. In: *Sulphur metabolism in higher plants*. Leiden, Backhuys Publishers, The Netherlands, 339–342.
- 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.

**-R-**

- Rathke GW, Christen O, Diepenbrock W** (2005) Effects of nitrogen source and rate on productivity and quality of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) grown in different crop rotations. *Field Crops Research* **94**, 103-113.
- Rathke GW, 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 and Environment* **117**, 80-108.
- Rausch T & Wachter A** (2005) Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Plant Science* **10**, 503-509.
- Ravanel S, Gakière B, Job D, Douce R** (1998) The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 7805–7812.
- Rendig VV, Optua C, MacComb EA** (1976) Effects of sulfur deficiency on non-protein nitrogen, soluble sugars and N/S ratios in young corn (*Zea mays* L.) plants. *Plant Soil* **44**, 423–437.
- Reuveny Z, Dougall DK, Trinity PM** (1980) Regulatory coupling of nitrate and sulfate assimilation pathways in cultured tobacco cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **77**, 6670-6672.
- Rossato L, Laine P, Ourry A** (2001) Nitrogen storage and remobilisation 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.

**Rouached H, Wirtz M, Alary R, Hell R, Arpat AB., Davidian JC, Fourcroy P, Berthomieu P** (2008) Differential regulation of the expression of two High-Affinity sulfate transporters, SULTR1.1 and SULTR1.2, in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **147**, 897-911.

**-S-**

**Saito K, Miura N, Yamazaki M, Hirano H, Murakoshi I** (1992) Molecular cloning and bacterial expression of cDNA encoding a plant cysteine synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **89**, 8078–8082.

**Saito K** (2000) Regulation of sulphate transport and synthesis of sulphur-containing amino acids. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 188–195.

**Saito K** (2004) Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. *Plant Physiology* **136**, 2443-2450.

**Sakai H, Hua J, Chen QG, Chang C, Medrano LJ, Bleeker AB, Meyerowitz EM** (1998) ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 5812-5817.

**Salac I** (2005) Influence of the sulphur and nitrogen supply on S metabolites involved in sulphur induced resistance (SIR) of *Brassica napus* L. *Landbauforschung Völkenrode*, Thèse de doctorat, 134p.

**Scherer HW** (2001) Sulfur in crop production. *European Journal of Agronomy* **14**, 81-111.

**Schjoerring JK, Bock JGH, Gammelvind L, Jensen CR, Mogensen VO** (1995) Nitrogen incorporation and remobilisation in different shoot components of field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) as affected by rate of nitrogen application and irrigation. *Plant Soil*, **177**, 255-264.

**Schnug E, Haneklaus S, Murphy D** (1993). Impact of sulphur fertilization on fertilizer nitrogen efficiency. *Sulphur in Agriculture* **17**, 8-12.

**Schnug E, Ernst WHO, Kratz S, Knolle F, Haneklaus S** (2004) Aspect of ecotoxicology of sulphur in the Harz region – a guide excursion. *Landbauforschung Völkenrode* **3**, 129-143.

**Sexton PJ, Paek NC, Shibles R** (1998) Soybean sulfur and nitrogen balance under varying levels of available sulfur. *Crop Science* **38**, 975-982.

**Shepherd MA & Sylvester-Bradley R** (1996) Effect of nitrogen fertilizer applied to winter oilseed rape (*Brassica napus*) on soil mineral nitrogen after harvest and on the response of a succeeding crop of winter wheat to nitrogen fertilizer. *Journal of Agricultural Science* **126**, 63–74.

**Smart C** (1994) Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist*, **126**, 419-448.

- Smart CM, Hosken SE, Thomas H, Greaves JA, Blair BG, Schuch W** (1995) The timing of maize leaf senescence and characterization of senescence-related cDNAs. *Physiologia Plantarum* **93**, 673–682.
- Smith IK & Lang AL** (1988). Translocation of sulfate in soybean (*Glycine max* L. Merr). *Plant Physiology* **86**, 798–802.
- Smith FW, Ealing PM, Hawkesford MJ, Clarkson DT** (1995) Plant members of a family of sulfate transporters reveal functional subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **92**, 9373–9377.
- Smith FW, Hawkesford MJ, Ealing PM, Clarkson DT, Vanden Berg PJ, Belcher AR, Warrilow AGS** (1997) Regulation of expression of a cDNA from barley roots encoding a high affinity sulphate transporter. *Plant Journal* **12**, 875-884.
- Studer R, Merrien A, Devineau J** (1987) Données nouvelles sur l'absorption du soufre par le colza d'hiver en campagne berrichonne. *Rapport INRA de Châteauroux* 8p.
- Sunarpi & Anderson JW** (1996) Distribution and redistribution of sulfur supplied as [<sup>35</sup>S]sulfate to roots during vegetative growth of soybean. *Plant Physiology* **11**, 1151-1157.
- Sunarpi & Anderson JW** (1997) Effect of nitrogen on the export of sulphur from leaves in soybean. *Plant and Soil* **188**, 177–187.
- Sunarpi & Anderson JW** (1997a) Allocation of S in generative growth of soybean. *Plant Physiology* **114**, 687–693.
- Sunarpi & Anderson JW** (1997b) Effect of nitrogen nutrition on remobilization of protein sulfur in the leaves of vegetative soybean and associated changes in soluble sulfur metabolites. *Plant Physiology* **115**, 1671-1680.
- Sunarpi & Anderson JW** (1998). Direct evidence of the involvement of the root in the redistribution of sulfur between leaves. *Journal of Plant Nutrition* **21**, 1273–1286.
- Suter M, von Ballmoos P, Kopriva S, Op den Camp R, Schaller J, Kuhlemeier C, Schürmann P, Brunold C** (2000) Adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase and adenosine 5'-phosphosulfate reductase are identical enzymes. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 930–936.

**-T-**

- Tabe L & Droux M** (2001) Sulfur assimilation in developing lupin cotyledons could contribute significantly to the accumulation of organic sulfur reserves in the seed. *Plant Physiology* **126**, 176-187.
- Takahashi H, Yamazaki M, Sasakura N, Watanabe A, Leustek T, de Almeida Engler J, Engler G, Van Montagu M, Saito K** (1997) Regulation of sulfur assimilation in higher plants: a sulfate transporter induced in sulfate-starved roots plays a central role in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **94**, 11102–11107.

**Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Smith FW, Blacke-Kalff MMA, Hawkesford MJ, Saito K** (2000) The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **23**, 171-182.

**Tittonel ED, Chaput JP, Letoublon F, Bonnot O** (1988) Reprise au printemps et mise à fleurs chez le colza d'hiver. CETIOM INRA Eds. In: *Physiologie et élaboration du rendement du colza*, Paris. 68-72.

**Tomatsu H, Takano J, Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Shibagaki N, Fujiwara T** (2007) An *Arabidopsis thaliana* high-affinity molybdate transporter required for efficient uptake of molybdate from soil. Proceedings of the National Academy of Sciences **104**, 18807–18812.

### -V-

**Van Der Kooij T, De Kok LJ, Haneklaus S, Schnug E** (1997) Uptake and metabolism of sulphur dioxide by *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **135**, 101-107.

**Varin S** (2009) Plasticité fonctionnelle du trèfle blanc en réponse à la disponibilité en soufre. Thèse de doctorat, Université de Caen, 137p.

**Vidmar JJ, Tagmount A, Cathala N, Touraine B, Davidian JC** (2000) Cloning and characterization of a root specific high-affinity sulfate transporter from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **475**, 65-69.

**Vis H & Goujard O** (2005) Comprendre la place du soufre dans la fertilisation. 7<sup>èmes</sup> rencontres COMIFER/GEMAS, 15 novembre, Blois.

**Vong PC, Nguyen C, Guckert A** (2007) Fertilizer sulphur uptake and transformations in soil as affected by plant species and soil type. *European Journal of Agronomy* **27**, 35–43.

### -W-

**Walker KC & Booth EJ** (1994) Sulphur deficiency in Scotland and the effects of sulphur supplementation on yield and quality of oilseed rape. *Norwegian Journal of Agricultural Science* **15**, 97-104.

**Warrilow AGS & Hawkesford MJ** (1998) Separation, subcellular location and influence of sulphur nutrition on isoforms of cysteine synthase in spinach. *Journal of Experimental Botany* **49**, 1625–1636.

**Weber M, Suter M, Brunold C, Kopriva S** (2000) Sulfate assimilation in higher plants: characterization of a stable intermediate in the adenosine 5'-phosphosulfate reductase reaction. *European Journal of Biochemistry* **267**, 3647–3653.

### -Y-

**Yoshimoto N, Takahashi H, Smith FW, Yamaya T, Saito K** (2002) Two distinct high-affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate uptake of sulfate in *Arabidopsis* roots. *The plant Journal* **29**, 465-473.

**Yoshimoto N, Inoue E, Saito K, Yamaya T, Takahashi H** (2003) Phloem-localizing sulfate transporter, Sultr1;3, mediates re-distribution of sulfur source to sink organs in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **131**, 1511-1517

**Yoshimoto, N., Inoue, E., Watanabe-Takahashi, A., Saito, K., Takahashi, H.** (2007) Posttranscriptional regulation of high-affinity sulfate transporters in *Arabidopsis* by sulfur nutrition. *Plant Physiology* **145**, 378-388.

## -Z-

**Zhao F, Bilsborrow PE, Evans EJ, Syers JK** (1993) Sulphur turnover in the developing pods of single and double low varieties of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of the science of Food and Agriculture* **62**, 111-119.

**Zhao F, Evans EJ, Bilsborrow PE, Syers JK** (1994) Influence of nitrogen and sulphur on the glucosinolate profile of rapeseed (*Brassica napus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **64**, 295-304.

**Zhao FJ, Hawkesford MJ, Warrilow AGS, McGrath SP, Clarkson DT** (1996) Responses of two wheat varieties to sulphur addition and diagnosis of sulphur deficiency. *Plant and Soil* **181**, 317-327.

**Zhao F J, Bilsborrow PE, Evans EJ, McGrath SP** (1997) Nitrogen to sulphur ratio in rapeseed and in rapeseed protein and its use in diagnosing sulphur deficiency. *Journal of Plant Nutrition* **20**, 549-558.

**Zuber H, Aubert G, Davidian JC, Thompson R, Gallardo K** (2009) Sulfur metabolism and transport in developing seeds. Sirko A, De Kok LJ, Haneklaus S, Hawkesford MJ, Rennenberg H, Saito K Schnug E and Stulen I. Eds. In: *Sulphur metabolism in higher plants. Regulatory aspects significance of sulfur in the food chain, agriculture and the environment*. Backhuys publishers, Leiden / Margrath publishers, Weikersheim, 113-117.

Nombre total de références : 176.

# Table des illustrations

---

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### Table des figures

<b>Figure I-1 :</b>	<b>A :</b> Evolution des surfaces cultivées d'oléagineuses dans l'Union Européenne.	
	<b>B :</b> Evolutions des surfaces de colza d'hiver entre 2004 et 2007 dans les départements des régions françaises du grand ouest.....	7
<b>Figure I-2 :</b>	Evolution des quantités de dioxyde de soufre dans l'air et origines des émissions de SO <sub>2</sub> de 1960 à 2005 en France métropolitaine.....	8
<b>Figure I-3 :</b>	Influence de la fertilisation soufrée sur l'efficacité d'utilisation réelle de l'azote (EUA réelle) par le colza d'hiver (variétés 00, Wiebke & Glumander) suivie trois années consécutives sur un même site (1985, 1986 et 1987) au nord de l'Allemagne. D'après Schnug et al., 1993.....	8
<b>Figure II-1 :</b>	Composition et exemples de débouchés industriels de l'huile (A) et du tourteau de colza dépourvu d'acide érucique (B).....	13
<b>Figure II-2 :</b>	<b>A :</b> Evolution de l'absorption cumulée de l'azote minéral (nitrate) au cours des principaux stades de développement du colza. Modifiée d'après Rossato et al., 2001. <b>B :</b> Exigence en S de 5 grandes cultures des Pays-Bas durant une année. (d'après Postma et al., 1999).....	17
<b>Figure II-3 :</b>	Rôles multiples du S dans le métabolisme des végétaux supérieurs (adaptée d'après Hesse et Hoefgen, 2003).....	19
<b>Figure II-4 :</b>	<b>A :</b> Schéma conceptuel des principales formes et des transformations du S dans le système sol-plante. D'après Fismes, 1998. <b>B :</b> Etapes d'oxydations du S élémentaire en sulfate.....	20
<b>Figure II-5 :</b>	<b>A :</b> Dépôt de SO <sub>2</sub> sur les feuilles. <b>B :</b> Absorption et circulation du sulfate sur l'ensemble de la plante selon le type de tissus considéré lorsque le sulfate est non limitant (adaptée d'après Buchner et al., 2004).....	21
<b>Figure II-6 :</b>	Arbre phylogénétique et localisation d'expression des gènes codant des transporteurs de sulfate des Brassicacées proposé par Parmar et al. (2007) par alignement de séquences codantes chez Arabidopsis.....	22
<b>Figure II-7 :</b>	<b>A :</b> Localisation tonoplastique de SULTR4;1 au sein de cellules épidermiques de l'apex racinaire d'Arabidopsis, observée en microscopie confocale par Kataoka et al. (2004). <b>B :</b> Modèle hypothétique des rôles des transporteurs de sulfate vacuolaires du groupe 4 chez les plantes vasculaires, d'après Kataoka et al. (2004).....	23



<b>Figure II-8 :</b> <i>Transport et voies d'assimilation réductrice/non réductrice du sulfate dans la cellule végétale, d'après Kopriva, 2006</i> .....	24
<b>Figure II-9 :</b> <i>Schéma de l'activité Sérine-acétyl-transférase, SAT (A) et O-acétylsérine thiolylase, OAS-TL (B) (adaptée d'après Hesse et al., 2004)</i> .....	25
<b>Figure II-10 :</b> <i>Rôle central de la cystéine dans le métabolisme soufré</i> .....	25
<b>Figure II-11 :</b> <i>Cartographie des zones à risque de déficience en soufre en fonction des retombées atmosphériques en Grande Bretagne</i> .....	26
<b>Figure II-12 :</b> <i>Conséquences agronomiques d'une faible disponibilité en S sur le colza d'hiver. A : photographie illustrant un champ sans apport de fertilisant soufré présentant les signes d'insuffisance en S par opposition à un champ correctement fertilisé. B : photographie de feuilles jeunes présentant les signes de chlorose et de pigmentation anthocyanique caractéristiques d'une carence en S</i> .....	26
<b>Figure II-13 :</b> <i>Conséquences agronomiques d'une faible disponibilité en S sur le colza d'hiver. A : Effet de différents niveaux de fertilisation en S sur la teneur en huile des graines de colza d'hiver pour un apport de 180 kg N. ha-1 (adaptée de McGrath et Zhao, 1996). B : photographie de siliques issues de plantes carencées en S par opposition aux siliques de plantes non carencées en S. C : photographie illustrant une fleur de colza aux couleurs et morphologies caractéristiques d'une carence en S par opposition à une fleur de plante non carencée en S</i> .....	27
<b>Figure II-14 :</b> <i>Modèle hypothétique de hiérarchisation des séquences d'évènements physiologiques intervenant au sein d'une plante carencée en S, élaboré à partir des différents modèles proposés par Hawkesford &amp; De Kok (2006), Hoefgen &amp; Nikiforova (2008) et Lewandowska &amp; Sirko (2008)</i> .....	28
<b>Figure II-15 :</b> <i>Niveaux d'expression (northern blots) des transporteurs de sulfate vacuolaires dans différents organes de colza soumis (S) ou non (+S) à une privation en S (Parmar et al., 2007)</i> .....	29
<b>Figure II-16 :</b> <i>Evolution de la quantité de RuBisCO par unité de surface dans les feuilles de Brassica juncea et Brassica campestris cultivés en présence ou absence de sulfate</i> .....	31
<b>Figure II-17 :</b> <i>Représentation schématique des cascades signalétiques impliquées dans les régulations possibles d'expression de gènes sensibles à l'auxine en réponse à une privation de S (adaptée d'après Nikiforova et al., 2005)</i> .....	33
<b>Figure II-18 :</b> <i>Les deux stratégies d'amélioration de l'utilisation du S proposées par Hawkesford (2000)</i> .....	34
<b>Figure II-19 :</b> <i>Evolution des teneurs en sulfate et S insoluble (essentiellement protéique) dans les feuilles âgées, matures et jeunes de plantes de colza cultivées en réponse à une restriction en S couplée ou non à une limitation en N (d'après Blake-Kalff et al., 1998)</i> .....	38
<b>Figure III-1 :</b> <i>Représentation schématique du dispositif expérimental mis en place pour l'étude des effets de différents niveaux de fertilisation en nitrate sur la mobilisation en S et N foliaire</i> .....	46

<b>Figure III-2 :</b> Représentation schématique du dispositif expérimental mis en place pour l'étude des effets d'une restriction en sulfate couplée ou non à une limitation en nitrate sur des plantes de colza au stade rosette.....	49
<b>Figure III-3 :</b> Représentation schématique du dispositif expérimental mis en place pour l'étude des effets d'une restriction en sulfate appliquée à différents stades ontogénétiques...	50
<b>Figure III-4 :</b> Photographie présentant la procédure d'annotation des rangs foliaires.....	51
<b>Figure III-5 :</b> Exemple de procédure de récolte suivie au stade de graines matures.....	51
<b>Figure III-6 :</b> SPAD (Soil Plant Analysis Development) (Minolta), appareil permettant de mesurer les teneurs relatives en chlorophylles.....	52
<b>Figure III-7 :</b> Spectromètre de masse de type IRMS couplé à un analyseur élémentaire C/N/S.....	53
<b>Figure III-8 :</b> Représentation schématique du protocole d'extraction du sulfate à partir de matériel lyophilisé de limbe foliaire.....	56
<b>Figure III-9 :</b> Représentations graphiques de la PCR quantitative (Q-PCR) en temps réel. (A) Courbe représentative d'une amplification par PCR quantitative. (B) Droite obtenue par dilutions en série d'un échantillon d'ADNc donné après PCR quantitative en temps réel. (C) Courbe de fusion représentant la dérivée première négative de la fluorescence en fonction de la température (-dF/dT).....	60
<b>Figure III-10 :</b> (A) Cinétique d'expression des gènes SAG12 et Cab par RT-PCR, au sein d'un rang foliaire de Colza. Le gène EF1- $\alpha$ est utilisé comme gène de référence. (B) Evolution cinétique des quantités de transcrits des gènes SAG12 et Cab déterminées par PCR semi-quantitative. (D'après Gombert et al., 2006).....	63
<b>Figure III-11 :</b> (A) Représentation schématique de l'expression des gènes SAG12 et Cab à un stade de développement donné dans les différents rangs foliaires de la plante. (B) Cinétique de progression de la sénescence foliaire le long de l'axe de la plante. (D'après Gombert et al., 2006) .....	64
<b>Figure IV-1 :</b> Changes in the chlorophyll (SPAD) (A), S concentration (B) and S amount (C), N concentration (D) and N amount (E) of the leaf rank #8 (Exp. G1) determined after 4 weeks of treatment under two levels of N fertilization in greenhouse-grown Brassica napus (cv. Capitol) .....	75
<b>Figure IV-2 :</b> S concentration (A) and S amount (B) of fallen leaves in Brassica napus (cv. Capitol) grown in controlled conditions under high level of N.....	75
<b>Figure IV-3 :</b> S concentration (A) and S amount (B), N concentration (C) and N amount (D) of fallen leaves in field-grown Brassica napus (cv. Capitol) under two levels of N.....	76
<b>Figure IV-4 :</b> S concentration (A) and N concentration (B) as function of accumulated dry matter in shoots in field-grown Brassica napus (cv. Capitol) under two levels of N.....	77
<b>Figure V-1 :</b> Changes in the fresh matter of oilseed rape shoots (A) and in dry matter of the leaf blade of the younger leaves (B1) and of leaf ranks #12 (B2), #10 (B3), #8 (B4) of oilseed rape in control plants (HS-HN), sulphate limited plants (LS-HN) and combined sulphate and nitrate limited plants (LS-LN) for the 28 days of treatments.....	95

- Figure V-2 :** Kinetics of the progression of leaf senescence along the axis of oilseed rape (A) in control plants (HS-HN), sulphate limited plants (LS-HN) and in combined sulphate and nitrate limited plants (LS-LN). Photography of old leaf (leaf rank #8) in combined sulphate and nitrate limited plants (LS-LN), control plants (HS-HN), and sulphate limited plants (LS-HN) (B).....96
- Figure V-3 :** Changes in the chlorophyll (SPAD) of the leaf ranks #8 (A) and #10 (B) of oilseed rape in control plants (HS-HN), sulphate limited plants (LS-HN) and in combined sulphate and nitrate limited plants (LS-LN) for 28 days of treatments.....96
- Figure V-4 :** Changes in the S and N amounts of the leaf blade of the leaf ranks #8 (A and B) and #10 (C and D) of oilseed rape in control plants (HS-HN), sulphate limited plants (LS-HN) and in combined sulphate and nitrate limited plants (LS-LN) for 28 days of treatments.....97
- Figure V-5 :** Changes in soluble protein amount in the leaf blade of the leaf ranks #8 (A) and #10 (B) of oilseed rape in control plants (HN-HS), sulphate limited plants (HN-LS) and in combined sulphate and nitrate limited plants (LN-LS) for 28 days of treatments.....97
- Figure V-6 :** Changes in the sulphate-sulphur amount and concentration in the leaf blade of the leaf ranks #8 (A and B) and #10 (C and D) of oilseed rape in control plants (HS-HN), sulphate limited plants (LS-HN) and in combined sulphate and nitrate limited plants (LS-LN) for 28 days of treatments.....98
- Figure V-7 :** Changes in the  $^{34}\text{S}$  amount in the leaf blade of the leaf ranks #8 (A) and #10 (B) of oilseed rape in control plants (HS-HN), sulphate limited plants (LS-HN) and in combined nitrate and sulphate limited plants (LS-LN) for 28 days of treatments.....99
- Figure V-8 :** Relative expression of *BnSultr4;1* and *BnSultr4;2* genes expression in the leaf ranks #8 (A and B) and #10 (C and D) of oilseed rape in control plants (HS-HN), sulphate limited plants (LS-HN) and in combined nitrate and sulphate limited plants (LS-LN) for 28 days of treatments.....100
- Figure V-9 (Supplemental data #1):** Results of RT-PCR analysis of *SAG12* and *Cab* gene expressions in leaves from control (HS-HN), LS-HN and LS-LN plants of oilseed rape, expressed as a percentage of the maximum of both transcripts obtained in overall leaf rank studied.....101
- Figure V-10 (Supplemental data #2):** Results of RT-PCR analysis of *BnSultr1;1* and *BnSultr1;2* gene expressions in lateral roots from control (HN-HS), HN-LS and LN-LS plants of oilseed rape.....106
- Figure VI-A-1 :** Schematic diagram of experimental design. Mineral S restriction (Low S, LS) was applied at GS 32 for LS32, GS 53 for LS53, or GS 70 for LS70, until the end of the growth cycle (GS99).....112
- Figure VI-A-2 :** Real photosynthesis values at GS 76 in leaf ranks #9 and #13 of oilseed rape plants grown under HS, LS32, LS53, or LS70 conditions.....116
- Figure VI-A-3 :** Dry matter (DM) partitioning at GS 81 in plants grown under HS, LS32, LS53, or LS70 conditions.....117
- Figure VI-A-4 :** S amount partitioning at GS 81 in plants grown under HS, LS32, LS53, or LS70 conditions. Vertical bars indicate  $\pm$ SE of the mean ( $n=12$  for HS,  $n=4$  for LS32, LS53, LS70).....117

<b>Figure VI-A-5 :</b> <i>N</i> amount partitioning at GS 81 in plants grown under HS, LS32, LS53, or LS70 conditions.....	118
<b>Figure VI-A-6 :</b> <i>Pictures of seeds (A), number of total seeds and viable seeds per plant (B) and seed composition evaluated by NIRS in total seeds (C) harvested at GS 99 on plants grown under HS, LS32, LS53, or LS70 conditions.....</i>	119
<b>Figure VI-A-7 :</b> <i>Final S amount and S harvest index (SHI) (A), and final N amount and N harvest index (NHI) (B) in mature seeds harvested at GS 99 on plants grown under HS, LS32, LS53, or LS70 conditions.....</i>	120
<b>Figure VI-A-8 :</b> <i>Final <sup>34</sup>S and <sup>15</sup>N harvest index (percentage of <sup>34</sup>S or <sup>15</sup>N in seeds relative to total <sup>34</sup>S or <sup>15</sup>N present in the whole plant at the beginning of S-restriction treatment) in plants grown under HS32, HS53, HS70, LS32, LS53, or LS70 conditions.....</i>	121
<b>Figure VI-A-9 :</b> <i>S amount partitioning at GS 70 under HS conditions and at GS 81 under LS70 or -S70 conditions. Vertical bars indicate ±SE of the mean (n=12 for HS, n=4 for LS70 and -S70) .....</i>	121
<b>Figure VI-B-1:</b> <i>Schematic diagram of experimental design. Mineral S restriction (Low S, LS) was applied at GS 32 (bolting stage) for LS32, GS 53 (visible bud stage) for LS53, or GS 70 (start of pod filling) for LS70, until the end of the growth cycle (GS 99) .....</i>	130
<b>Figure VI-B-2 :</b> <i><sup>34</sup>S partitioning (expressed as percentage of total <sup>34</sup>S labelling) in the different tissues of the plants from GS 32 to GS 81 in HS32 and LS32 (A), HS53 and LS53 (B), and HS70 and LS70 conditions (C) .....</i>	135
<b>Figure VI-B-3 :</b> <i><sup>15</sup>N partitioning (expressed as percentage of total <sup>15</sup>N labelling) in the different tissues of the plants from GS 32 to GS 81 in HS32 and LS32 (A), HS53 and LS53 (B), and HS70 and LS70 conditions (C) .....</i>	137
<b>Figure VI-B-4 :</b> <i>Flows in percentage of S remobilized and S taken up, and S amount present at GS 70 and GS 81 in seeds, pod walls, floral stem, stem, leaves, and roots of oilseed rape for control plants (HS70, A) and S deficient plants (LS70, B) during the reproductive stage.....</i>	138
<b>Figure VI-B-5 :</b> <i>Flows in percentage of N remobilized and N taken up, and N amount present at GS 70 and GS 81 in seeds, pod walls, floral stem, stem, leaves, and roots of oilseed rape for control plants (HS70, A) and N deficient plants (LS70, B) during the reproductive stage.....</i>	141
<b>Figure VI-B-6 :</b> <i>Residual S (A) and N (B) concentrations of fallen leaves in oilseed rape grown under high level of sulphate (HS) or under low level of sulphate (LS32, LS53, LS70).....</i>	142
<b>Figure VII-1 :</b> <i>Schéma récapitulatif des stades de développement du colza les plus sensibles à une restriction en S minéral déterminés selon les conséquences agronomiques des restrictions appliquées après GS 32.....</i>	152
<b>Figure VII-2:</b> <i>Diagramme récapitulatif des effets des traitements LS-HN, LS-LN, ou HS-LN sur la mobilisation des composés soufrés en comparaison avec la situation contrôle dans une feuille mature avant sa chute et l'expression de transporteurs de sulfate des groupes 4 et 1 (A). Les effets des traitements sur l'expression de transporteurs de sulfate au sein des racines soumises aux traitements LS-HN, LS-LN sont présentés en B.....</i>	157

**Figure VII-3:** Schéma synthétique des effets de restrictions en S et/ou en N exogènes sur la sénescence des feuilles et la remobilisation en sulfate.....160

## Table des Tableaux

**Tableau II-1 :** Principaux stades repères du développement ontogénétique du colza d'hiver, la nomenclature anglo-saxonne est indiquée entre parenthèses.....15

**Tableau II-2 :** Principaux engrais soufrés utilisables en France.....18

**Tableau II-3 :** Liste non exhaustive des gènes dont l'expression varie en réponse à une carence en S (-S) chez *Arabidopsis thaliana* par rapport à une situation « +S ». **A** : Gènes impliqués directement dans les premières étapes de la voie d'acquisition du sulfate, **B** : autres gènes régulés en réponse à une carence en S.....30

**Tableau III-1 :** Composition de la solution nutritive utilisée en hydroponie pour des plantes témoins HS-HN.....47

**Tableau III-2:** Composition de la solution nutritive utilisée (Hoagland ¼) pour la culture du colza sur perlite-vermiculite.....50

**Tableau III-3 :** Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour les PCR semi-quantitatives.....59

**Tableau III-4 :** Conditions d'amplification (PCR semi-quantitative) en fonction du gène à étudier.....60

**Tableau III-5 :** Couples d'amorces validés pour l'amplification de transporteurs de sulfate au sein des feuilles et/ou des racines de colza.....61

**Tableau VI-A-1:** Yield components at GS 99 of plants grown under HS, LS32, LS53, or LS70 conditions.....118

**Tableau VI-A-2:** Fatty acid composition in viable seeds harvested at GS 99 on plants grown under HS, LS32, LS53, or LS70 conditions.....120

**Tableau VI-B-1:** Number of viable seeds, seed composition evaluated by NIRS in total seeds, S Harvest Index (SHI) and N Harvest Index (NHI) at GS99 in plants subject to HS, LS32, LS53, and LS70 conditions.....134

**Tableau VI-B-2:** S utilization efficiency and N utilization efficiency at GS99 in HS, LS32, LS53, and LS70 conditions.....134

# Annexes

---

**Annexe 1 :** Poster présenté au 7<sup>ème</sup> congrès international du métabolisme soufré des végétaux, du 13 au 16 Mai 2008, Varsovie, Pologne (avec communication orale de 20 min).

**A  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  pulse-chase labeling method to study the S recycling in oilseed rape submitted to  $\text{SO}_4^{2-}$  deficiency during the rosette stage.**

**L. Dubousset, M. Abdallah, A.S. Desfeux, Ph. Etienne, F. Meuriot, J. Gombert, R. Segura, M.P Bataillé, S. Reze, J. Bonnefoy, A.S. Ameline, A. Ourry, F. Le Dily, J.C. Avice.**

*Université de Caen, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutriments N, C, S (EVA), INRA, F-14032 Caen, FRANCE*

The decrease of sulphate availability in soil, which is largely due to the decline of industrial rejections of  $\text{SO}_2$ , alters both grain yield and oil quality of oilseed rape (*Brassica napus* L.). Consequently, S fertilization is now recommended in many countries. In order to optimize the S fertilization (adjustment of the period and level of S fertilization to S demand of crop), it will be necessary i) to characterize the stages of crop cycle that are the most affected by S deficiency and ii) to understand the mechanisms which contributed to an efficient recycling of S compounds from source to sink tissues. In this context, our aim was to determine firstly if the rosette stage is a vegetative phase of development particularly affected by a transient S deficiency. To assess the S deficiency effects, a method of  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  pulse-chase labeling was used.

Fifteen days after sowing, plantlets were transferred in hydroponic conditions and labeled with 0.3 mM of  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ . After 50 days, the labeling was stopped and plants were submitted to two  $\text{SO}_4^{2-}$  treatments during 35 days: High S (HS) versus Low S (LS, 20 fold lower than HS). The incidence of  $\text{SO}_4^{2-}$  deficiency on S and  $^{34}\text{S}$  remobilization from source leaves was studied using isotope ratio mass spectrometry. These data were compared to the expression of the *BnSultr4;1* (a gene encoding a vacuolar  $\text{SO}_4^{2-}$  transporter implicated in  $\text{SO}_4^{2-}$  efflux). The senescence progression was studied using an accurate molecular indicator of leaf senescence status (*SAG12/Cab*) [1].

At rosette stage, the growth of young leaves in LS plants is significantly reduced only after 35 days compared to HS plants. After 35 days, the total S and  $\text{SO}_4^{2-}$  in maturing leaf of LS plants is 4 fold lower than HS plants while the soluble protein amount remains similar to HS plants. The  $^{34}\text{S}$  amount in maturing leaf of LS plants rapidly declines and is 2 fold lower than HS plants after 35 days. This large decline of  $^{34}\text{S}$  amount was associated with an induction of the expression of *BnSultr4;1* suggesting that vacuolar  $\text{SO}_4^{2-}$  is specifically remobilized to sustain the S demand for growth. It is concluded that when transient mineral S deficiency occurs at rosette stage, oilseed rape is able to maintain leaf growth by an optimization of the recycling of endogenous S compounds (especially  $\text{SO}_4^{2-}$ ) without any acceleration of leaf senescence process.

**Acknowledgement:** This work was supported by the French National Research Agency (ANR-COSMOS n°ANR-05-JC05-51097).

**References:**

[1] J. Gombert, P. Etienne, A. Ourry and F. Le Dily, Journal of Experimental Botany, 57, 1949 (2006)

**Annexe 2 :** Poster présenté au 7<sup>ème</sup> congrès international du métabolisme soufré des végétaux, du 13 au 16 Mai 2008, Varsovie, Pologne.

## Does mineral S availability alter S and <sup>34</sup>S dynamics during vegetative growth of rapeseed?

**M. Abdallah<sup>1</sup>, L. Dubousset, P. Etienne, M.P. Bataillé, J. Bonnefoy, J.-C. Avice, A. Ourry and F. Meuriot.**

Université de Caen, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutrition N, C, S (EVA), INRA, F-14032 Caen, FRANCE

<sup>1</sup> This work was supported by ANR-COSMOS : Colza et Soufre : cycle du soufre et Mobilisation des composés soufrés et azotés en réponse à une Oligotrophisation en Soufre: ANR-05-JC-05-51097

In higher plants, sulphur (S) is an essential element for crop yield and quality [1]. However, S availability has been decreasing in many areas of Europe since last decade [2], which severely reduced the yield by more than 40% [3]. Rapeseed (*Brassica napus* L.) is a plant of worldwide importance and it requires high inputs of S fertilizers. This plant is particularly sensitive to S deficiency because it has a high demand for S [4] in order to produce seeds with a high yield of protein with relatively large quantities of S-containing amino acids [5]. Even if the importance of S was well documented since many years [6], the physiological effects of S deficiency remain largely unclear. As a consequence, we studied the effects of mineral S deficiency on S fluxes during vegetative growth of rapeseed at both whole plant and leaf rank level (*i.e.* leaf tissues representing more than 80% of total biomass; data not shown).

Rapeseed plants were sown and grown in a greenhouse during six weeks in hydroponics with optimal N and with 300  $\mu\text{M}$   $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ . At this date, two treatments were applied during 35 days with 300  $\mu\text{M}$   $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  for control plants (+S) or with 15  $\mu\text{M}$   $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  for S deficient plants (-S). Natural light was supplemented with phytolamps (150  $\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  of photosynthetically-active radiation) for 16 h with a thermoperiod of 24°C (day) and 18 °C (night).

Our results highlight that S deficient plants showed no significant differences either on whole plant and leaf rank biomasses, when compared to control plants. However, either for whole plant and leaf ranks total S and <sup>34</sup>S (*i.e.* deriving from S uptake) amounts are greatly reduced after 35 days. For example, plant total S amount was decreased from 159 mg. plant<sup>-1</sup> for control plants to 57 mg. plant<sup>-1</sup> for S deficient plants.

Even if S deficient plants had 20 times less mineral S than control plants, and therefore presents contrasted S managements (total S and <sup>34</sup>S), their development remained surprisingly unchanged. This could be due to the plant high initial S level (*i.e.* S reserves). As a conclusion, during its vegetative growth, our results highlight that rapeseed presents a great physiological adaptation through the fine management of S fluxes within the plant. As suggested by Gleeson [7], this adaptation is mediated by optimization of S cycling within the plant. However, and because S deficiency can reduce the yield by more than 40% [3], this great adaptation should be solely effective on a short time scale (*i.e.* vegetative growth).

**Acknowledgements:** The authors wish to acknowledge Raphael Segura, Anne-Sophie Desfeux, Julie Gombert and Anne-Francoise Ameline. This work was supported by a Ph. D grant from the Egyptian ministry of higher education and research.

### References:

- [1] S.P. McGrath, F.J. Zhao and P.J.A. Withers. Proceedings of the Fertiliser Society No. 379. The Fertiliser Society, Peterborough, UK (1996).
- [2] F.J. Zhao, P.J.A. Withers., S.E. Salmon, E.J. Evans, P.R. Shewry and S.P. McGrath. *Soil Sci. Plant Nutr.* 43, 1137– 1142 (1997).
- [3] H.W. Scherer. *Eur. J. Agronomy* 14: 81-111. (2001).
- [4] M. Holmes. Crop. Applied Science Publishers, London (1980).
- [5] F.J. Zhao, P.E. Bilsborrow, E.J. Evans and S.P. J. McGrath. *Plant Nutr.* 20: 549–558 (1997).
- [6] M. Blake-kalff, M. Hawkesford, F.J. Zhao and S. McGrath. *Plant and Soil* 225: 95-107. (2000).
- [7] S.K. Gleeson and D.Tilman. *Am. Nat.* 139, 1322-1343. (1992).



**Annexe 3 :** Poster présenté au colloque sur les réserves végétales et leur importance agronomique et sylvicole, les 9 et 10 Juin 2009, Caen, France.

### **Effect of S availability on S uptake and remobilization during the vegetative growth of *Brassica napus* L.**

**M. Abdallah<sup>1</sup>; L. Dubousset<sup>1</sup>; F. Meuriot<sup>1</sup>; P. Etienne<sup>1</sup>; J-C. Avice<sup>1</sup>; A. Ourry<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Université de Caen, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutriments N, C, S (EVA), INRA, F-14032 Caen, FRANCE

Because it has a high demand for S, oilseed rape (*Brassica napus* L.) is particularly sensitive to sulphur (S) deficiency. However, research on crop S nutrition still lags far behind than that on other major nutrients like N. Moreover, the physiological effects of S deficiency remain fairly unclear, especially during the rosette stage of the plant. As a consequence, we studied the effects of mineral S deficiency on N and S uptake and remobilization during vegetative growth of rapeseed at both whole plant and leaf rank level for plants grown during 35 days with 300  $\mu\text{M}$   $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  (control plants; +S) or with 15  $\mu\text{M}$   $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  (S deficient plants; -S).

Our results highlight that S deficient plants showed no significant differences either on whole plant and leaf biomasses, when compared to control plants. However, total S and  $^{34}\text{S}$  (*i.e.* deriving from S uptake) contents are greatly reduced either for whole plant and leaf after 35 days, and a greater redistribution of endogenous S from leaves to the benefit of roots is observed. The relative expression of tonoplastic and plasmalemic sulphate transporters is also strongly induced in the meantime in the roots.

As a conclusion, and even if S deficient plants had 20 times less mineral S than control plants, their development remained surprisingly unchanged. Oilseed rape thus presents a great physiological adaptation through an optimization of the recycling of endogenous foliar S compounds (mostly sulphate) which takes place to delay the possible perception of stress in roots. However, and because S deficiency can reduce the yield by more than 40%, this great adaptation should be solely effective on a short time scale (*i.e.* vegetative growth).

**Key Words:**  $^{15}\text{N}$  labelling,  $^{34}\text{S}$  labelling, Sulphur deficiency, S transporter, sulphate

**Annexe 4 :** Poster présenté au colloque sur les réserves végétales et leur importance agronomique et sylvicole, les 9 et 10 Juin 2009, Caen, France.

## Is the remobilization of S and N reserves for seed filling of winter oilseed rape modulated by sulphate restrictions applied at different growth stages ?

**L. Dubousset<sup>1</sup>; N. Nesi<sup>2</sup>; V. Gautier<sup>2</sup>; P. Etienne<sup>1</sup>; J-C. Avice<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Université de Caen, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutrition N, C, S (EVA), INRA, F-14032 Caen, FRANCE

<sup>2</sup>Université de Rennes1, UMR118 INRA-Agrocampus, Amélioration des Plantes et Biotechnologies Végétales, F-35653, Le Rheu, FRANCE.

Oilseed rape (*Brassica napus* L.) is a crop plant very demanding in both sulphate and nitrate which paradoxically exhibits a weak S and N remobilization leading to a low sulphur (S) and nitrogen (N) use efficiency. For about twenty years, the decrease of the industrial rejections of S (about -50% between 1980 and 2000 in France) results in a sulphate impoverishment of the soil. The changes of S and N metabolisms caused by the decline of sulphate availability in soil severely alter the agronomic performances of oilseed rape.

Thus, assuming that an efficient recycling of S and N compounds from vegetative parts to seeds may improve the responses of oilseed rape to transient S deficiency, our goal was to study how low mineral sulphate availability applied at different growth stages impacts on S and N remobilization and yield components. For that purpose, plants were grown under controlled conditions, and after treatment for vernalization, were submitted to mineral sulphate restriction (8.7  $\mu\text{M SO}_4^{2-}$ ) applied at GS 32 (bolting stage) for LS32, GS 53 (visible bud stage) for LS53, or GS 70 (start of pod filling) for LS70. These S-limited plants were compared with control plants that received 508.7  $\mu\text{M SO}_4^{2-}$  during the whole cycle of development. In order to determine the rate of S and N remobilization from vegetative tissues to seeds a long-term double  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  and  $^{15}\text{NO}_3^-$  labelling was applied from the end of vernalization period (GS 16) until the beginning of each S-restriction period. The  $^{34}\text{S}$  or  $^{15}\text{N}$  amounts in mature seeds were used to calculate the tracer harvest index (expressed as % of total  $^{34}\text{S}$  or  $^{15}\text{N}$  present in whole plants at the beginning of S-restriction treatment).

Globally, in response to S restrictions, the number of total seeds produced was not significantly affected in comparison with control. Nevertheless, in LS32 conditions, the coloring and number of viable seeds as well as the S and N amounts in grain were significantly affected. Besides, the seed quality was altered in response to this treatment (changes in glucosinolates, proteins and oil contents). In LS53 conditions, S amount, glucosinolates, and oil contents in seeds were significantly reduced while the N amount remained similar to control. The LS70 treatment had no effect on the yield components. Through mobilization, vegetative parts contributed to seed S content by about 30.6 % of total  $^{34}\text{S}$  in control plants. This  $^{34}\text{S}$  harvest index was up to 70 % in response to the LS32, L53 and LS70 treatments. The  $^{15}\text{N}$  harvest index was significantly reduced in LS32 conditions.

Overall data demonstrate that (i) in response to moderate sulphate limitation in soil, oilseed rape can optimize the mobilization of S reserves from vegetative organs to seeds, (ii) the mineral S availability between GS 32 and GS 53 would be determinant for seed filling process and grain quality, and (iii) severe sulphate restriction (at GS 32) impacts on both S and N remobilization processes. A better understanding of S and N recycling processes would help to optimize the agronomic practices for S fertilization of oilseed rape crops.

**Key words:** oilseed rape, sulphate restriction,  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  and  $^{15}\text{NO}_3^-$  labelling, S reserves, harvest index, yield, seed quality.

---

**DUBOUSSET Lucie. 2009.**

**Titre – Effet d’une restriction en sulfate couplée ou non à une limitation en nitrate sur l’efficacité de mobilisation du S et du N foliaire chez le colza d’hiver (*Brassica napus* L.).** Ecole Doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement / Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée / Thèse de l’Université de Caen.

---

**Résumé –** L’étude des impacts physiologiques et agronomiques d’une limitation en soufre (S) minéral chez le colza (*Brassica napus* L.) – une oléagineuse très exigeante en S mais caractérisée par une faible efficacité d’utilisation du S (EUS) – présente un intérêt tout particulier dans le contexte actuel d’appauvrissement des sols en S associé à la baisse des dépôts atmosphériques. Les objectifs ont donc visé (1) à déterminer les stades de développement les plus sensibles à la limitation en S, (2) à identifier les processus de mobilisation/allocation du S et du N (*via* des marquages  $^{15}\text{N}/^{34}\text{S}$ ) et (3) à évaluer les effets de la disponibilité en N sur ces processus.

Une relation allométrique semblable à celle du N vis-à-vis de la biomasse des parties aériennes n’a pu être établie pour le S. Quelle que soit la disponibilité en N, une séquestration du sulfate dans les feuilles de plantes bien alimentées en S a été révélée en serre et au champ. En cas de limitation en S, le sulfate stocké au niveau foliaire serait efficacement remobilisé vers les tissus en croissance *via* l’induction des transporteurs tonoplastiques (*BnSultr4;1* et *BnSultr4;2*) intervenant dans son efflux. Une restriction en S au stade C2 (entre-noeuds visibles) affecte l’efficacité d’utilisation du N. Le remplissage des graines et la qualité de l’huile sont dépendants de la disponibilité en S entre les stades C2 et D2 (boutons floraux visibles).

L’ensemble des résultats montrent que la faible EUS du colza est liée à une mauvaise mobilisation du sulfate foliaire et qu’une fertilisation raisonnée en S couvrant les besoins jusqu’en début de floraison permettrait d’améliorer l’EUS tout en maintenant rendement et qualité des graines.

---

**Mots clés – Indexation rameau :**

PLANTES—EFFETS DU SOUFRE / PLANTES—EFFETS DE L’AZOTE / ISOTOPES STABLES EN PHYSIOLOGIE VEGETALE / COLZA / CULTURES—RENDEMENTS / SOUFRE / PLANTES—ECOPHYSIOLOGIE.

---

**Title – Effect of a sulphate restriction coupled or not to a nitrate limitation on the S and N foliar mobilization efficiency in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.).** Ecole Doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement / Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée / PhD thesis in University of Caen.

---

**Abstract –** The survey of the physiological and agronomic impacts of a mineral sulphur (S) limitation in oilseed rape (*Brassica napus* L.) – an oleagenous very demanding in S but characterized by a weak S use efficiency (SUE) – is of particular interest in the current context of S impoverishment in soils associated with the decrease of atmospheric deposits. Thus, the goals were targeted to (1) determine the stages of development the most sensitive to the S limitation, (2) identify the processes of S and N mobilization/allocation (*via*  $^{15}\text{N}/^{34}\text{S}$  labellings) and (3) evaluate the effects of the N availability on these processes.

An allometric relationship similar to N with shoot biomass could not be established for S. Whatever the availability in N, a sequestration of sulphate in leaves of plants well supplied with S was revealed in greenhouse and in field experiments. In case of S limitation, the sulfate stored in leaves would be efficiently remobilized towards growing tissues *via* the induction of tonoplastic transporters (*BnSultr4;1* and *BnSultr4;2*) involved in its efflux. A S restriction at the stage C2 (bolting) affects the N use efficiency. The grain filling and the oil quality depend on the S availability between C2 and D2 (visible buds).

Overall results show that the weak SUE in oilseed rape is related to a weak mobilization of sulphate in leaves and that an adapted S fertilization covering the requirements until the beginning of flowering would allow improving the SUE while maintaining seed yield and quality.

---

**Discipline :** Biologie et Environnement des populations

---